

**Daniela Werner Ribeiro**

**Morfogênese *in vitro* da videira: variedades  
Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon**

Florianópolis  
2006

**Daniela Werner Ribeiro**

**Morfogênese *in vitro* da videira: variedades  
Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais, no Curso de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientação: Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva

Florianópolis  
2006

## **DEDICATÓRIA**

**“Descobri que te amo demais,  
descobri em você minha paz,  
descobri sem querer a vida,  
Verdade”**

***Nelson Rufino***

**Este trabalho é dedicado**

**AOS MEUS PAIS, JOÃO E JÚLIA  
AOS MEUS AVÓS, ERNESTO E ALAYDE  
AO MEU NOIVO, RICARDO**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Aparecido Lima da Silva, o qual pôs o Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal a minha disposição, dando-me oportunidade de realizar e concluir meu mestrado, e por me mostrar o caminho da pesquisa, da ética e do profissionalismo.

Ao professor Dr. Marcelo Maraschin pelo respeito e amizade, estando sempre presente para qualquer esclarecimento.

A Luisa e Gabriela pela atenção e disponibilidade, auxiliando na verificação de informações valiosas presentes no trabalho.

A Bernadete pelos conselhos, paciência, ajuda e serviços prestados na Secretaria da Pós-graduação.

Aos meus pais, Maria Júlia e João Ribeiro, a minha avó Alayde e aos meus irmãos, Carolina e Leandro, pelos ensinamentos a mim direcionados, que auxiliaram em minha formação pessoal, fundamentando meus princípios éticos e morais.

Ao meu noivo Ricardo, que sorriu com minhas conquistas, deu-me força nas derrotas e suportou meus momentos de agonia.

Aos meus tios Êdela e Lauro Bacca pelo incentivo e torcida.

As minhas queridas amigas Camila, Juliana, Isabela, Liana, Maris, Karine, Priscilla, Maritza e Elaine Stholf, que fizeram meus momentos de estudo e de lazer mais agradáveis e compreenderam meus momentos de ausência.

Aos amigos do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Carol, Fábio, Fernanda, Liliane, Luciano, Luiz Pacheco, Mariane, Pópo, Priscila, Shana, Shirley, Taiza, Thaysi, Voltolini e Zaqueu pelo auxílio nos trabalhos práticos e bela convivência.

Aos colegas do RGV Natasha, Celso, Kadine, Alexandre Siminski, Guilherme, Caffer, Douglas, Cíntia, Graziela e Sandra pela companhia e amizade.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais e do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Agradeço principalmente a Deus por ter posto todos no meu caminho.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>II</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>III</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
2.1. Propagação da videira .....	5
2.2. Propagação <i>in vitro</i> da videira .....	6
2.3. Organogênese .....	8
2.4. Embriogênese somática .....	11
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
3.1. Objetivo geral .....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>4.1. Desenvolvimento <i>in vitro</i> de brotações através de gemas axilares .....</b>	<b>16</b>
4.1.1. Material vegetal .....	16
4.1.2. Meios de cultura .....	16
4.1.3. Avaliação Morfológica .....	17
<b>4.2. Calogênese e Organogênese .....</b>	<b>18</b>
4.2.1. Material vegetal .....	18
4.2.2. Meios de cultura .....	18
4.2.3. Procedimento.....	18
4.2.4. Avaliação .....	19
<b>4.3. Indução da Embriogênese Somática.....</b>	<b>19</b>
4.3.1. Material Vegetal.....	19
4.3.2. Meios de cultura .....	19

4.3.3. Procedimento.....	20
4.3.4. Avaliação .....	20
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>22</b>
5.1. Desenvolvimento <i>in vitro</i> de brotações através de gemas axilares .....	22
5.2. Calogênese e Organogênese .....	27
5.3. Indução da embriogênese somática.....	38
<b>6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>49</b>
<b>7. RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>50</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**2,4-D:** ácido 2,4 diclorofenóxiacético (auxina)

**AIB:** ácido indolbutírico (auxina)

**ANA:** ácido naftalenoacético (auxina)

**B5:** Gamborg *et al.*, 1968 (meio de cultura)

**BAP:** 6- benzilaminopurina (citocinina)

**DSD1:** Lima da Silva & Doazan, 1995 (meio de cultura)

**KIN:** cinetina (citocinina)

**ME:** Torregrosa, 1998 (meio de cultura)

**MS:** Murashige & Skoog, 1962 (meio de cultura)

**MS/2:** Murashige & Skoog, 1962 com a metade da concentração de sais (meio de cultura)

**NOA:** ácido naftóxiacético

**NN:** Nitsch & Nitsch, 1969 (meio de cultura)

**N-1:** Nitsch & Nitsch, 1969. modificado (meio de cultura)

**TDZ:** Thidiazuron [1-phenyl-3-(1,2,3-thidiazol-5-yl)-urea] (citocinina)

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Características morfológicas das variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon após 60 dias de cultura *in vitro* nos meios de cultura ME<sup>(1)</sup>, DSD1<sup>(2)</sup> e B5<sup>(3)</sup>. \_\_\_\_\_ 22
- Tabela 2. Quantidade de massa seca das folhas, raízes e caule das variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon após 60 dias *in vitro*, nos meios de cultura ME<sup>(1)</sup>, DSD1<sup>(2)</sup> e B5<sup>(3)</sup>. \_\_\_\_\_ 24
- Tabela 3. Médias de calos formados entre as variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon nos meios de cultura ME<sup>(1)</sup> e B5<sup>(2)</sup>, acrescidos de BAP/ANA<sup>(3)</sup> ou TDZ/ANA<sup>(3)</sup>, após 30 dias de cultura *in vitro*. \_\_\_\_\_ 28
- Tabela 4. Porcentagem de calos formados *in vitro*, após 35 dias, das variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968) com discos foliares (F) e pecíolos (P) como fontes de explantes. \_\_\_\_\_ 39



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Metodologia para classificação de proliferação celular quanto à área. 21
- Figura 2. Porcentagem de calos formados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), acrescidos de BAP ou TDZ (5, 10, 20  $\mu\text{mol}$ ) e ANA (0,2  $\mu\text{mol}$ ). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias. \_\_\_\_\_ 30
- Figura 3. Coloração dos calos da variedade Paulsen 1103 formados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), acrescidos de BAP ou TDZ (5, 10, 20  $\mu\text{mol}$ ) e ANA (0,2  $\mu\text{mol}$ ). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias. \_\_\_\_\_ 31
- Figura 4. Coloração dos calos da variedade VR 043-43 formados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), acrescidos de BAP ou TDZ (5, 10, 20  $\mu\text{mol}$ ) e ANA (0,2  $\mu\text{mol}$ ). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias. \_\_\_\_\_ 32
- Figura 5. Coloração dos calos da variedade Cabernet Sauvignon formados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), acrescidos de BAP ou TDZ (5, 10, 20  $\mu\text{mol}$ ) e ANA (0,2  $\mu\text{mol}$ ). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias. \_\_\_\_\_ 33
- Figura 6. Textura dos calos da variedade Paulsen 1103 formados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), acrescidos de BAP ou TDZ (5, 10, 20  $\mu\text{mol}$ ) e ANA (0,2  $\mu\text{mol}$ ). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias. \_\_\_\_\_ 34
- Figura 7. Textura dos calos da variedade VR 043-43 formados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), acrescidos de BAP ou TDZ (5, 10, 20  $\mu\text{mol}$ ) e ANA (0,2  $\mu\text{mol}$ ). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias. \_\_\_\_\_ 35
- Figura 8. Textura dos calos da variedade Cabernet Sauvignon formados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), acrescidos de BAP ou TDZ (5, 10, 20  $\mu\text{mol}$ ) e ANA (0,2  $\mu\text{mol}$ ). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias. \_\_\_\_\_ 36
- Figura 9. Proliferação de calos induzidos a partir de pecíolos inoculados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1962) avaliada em três variedades de videira: Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon. Meios de cultura acrescidos de 2,4-D (5  $\mu\text{mol}$ ) e BAP (1  $\mu\text{mol}$ ). Barras verticais representam os desvios padrões das médias. \_\_\_\_\_ 41
- Figura 10. Calos de videira: a – Cabernet Sauvignon (coloração branca); b – Paulsen 1103 (coloração bege-clara); c – VR 043-43 (coloração bege-escura); d – VR 043-43 (coloração amarronzada). Imagens obtidas através de microscópio estereoscópio OLYMPUS SZH10, zoom 0,7. \_\_\_\_\_ 43

Figura 11. Coloração dos calos induzidos a partir de pecíolos inoculados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1962) avaliada em três variedades de videira: Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon Meios de cultura acrescidos de 2,4-D (5  $\mu$ mol) e BAP (1  $\mu$ mol). Barras verticais representam os desvios padrões das médias. \_\_\_\_\_ 44

Figura 12. Textura dos calos induzidos a partir de pecíolos inoculados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1962) avaliada em três variedades de videira: Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon. Meios de cultura acrescidos de 2,4-D (5  $\mu$ mol) e BAP (1  $\mu$ mol). Barras verticais representam os desvios padrões das médias. \_\_\_\_\_ 46

Figura 13. Aspectos dos calos de três variedades de videira. (a) Paulsen 1103, meio ME (Torregrosa, 1998) acrescido de 2,4-D (5  $\mu$ mol) e BAP (1  $\mu$ mol); (b) VR 043-43, meio ME acrescido de 2,4-D (5  $\mu$ mol) e BAP (1  $\mu$ mol); (c) Cabernet Sauvignon, meio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) ) acrescido de 2,4-D (5  $\mu$ mol) e BAP (1  $\mu$ mol); (d) Cabernet Sauvignon, meio ME acrescido de 2,4-D (5  $\mu$ mol) e BAP (1  $\mu$ mol). Fotografias em microscópio óptico OLYMPUS BX40, 100X. \_\_\_\_\_ 48

## RESUMO

A viticultura no Brasil hoje é uma atividade consolidada e de grande importância sócio-econômica para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Nestes ainda se constitui numa exploração agrícola fixadora do homem ao ambiente rural. A partir de 1998, com o empenho da indústria vitivinícola houve um aumento da área plantada e da demanda de uva, tanto para vinho quanto para mesa e suco. Mesmo assim verifica-se de forma acentuada que o grande problema do setor vitícola, principalmente o Catarinense é a falta de mudas com garantia de qualidade e livres de doenças e pragas, ofertadas aos produtores. Para isso, diversas metodologias de propagação *in vitro* foram e vem sendo desenvolvidas para a multiplicação em larga escala de plantas de videira sadias e com características agronômicas especiais desejadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar metodologias de propagação via desenvolvimento de gemas axilares, calogênese/organogênese e embriogênese somática a fim de contribuir para processos de multiplicação *in vitro*. Para isto, foram selecionados os porta-enxertos Paulsen 1103 e VR 043-43 e a variedade vinífera Cabernet Sauvignon. Constatou-se que a metodologia de gemas axilares, sem o uso de reguladores de crescimento, é uma técnica eficiente para propagação *in vitro* e apropriada para seleção, multiplicação e conservação de germoplasma *in vitro*. No entanto, a metodologia para calogênese e organogênese, através de explantes foliares não mostrou resultados animadores na produção de gemas, brotos e raízes. Para a embriogênese somática, a variedade Cabernet Sauvignon apresentou calos com aspecto embriogênico, mas não foi possível a obtenção de todas as fases de embriogênese somática. O Paulsen 1103 respondeu bem aos estímulos dos meios de cultura, principalmente quando enriquecidos com vitaminas e aminoácidos. Já o VR 043-43 e Cabernet Sauvignon apresentaram-se mais seletivos aos meios mais leves ou menos ricos em nutrientes. Os resultados dos três trabalhos permitiram estabelecer diferenças genotípicas *in vitro* entre as três variedades avaliadas.

## ABSTRACT

The Brazilian viticulture is an activity consolidate with meaningful social and economical importance to Rio grande do Sul and Santa Catarina States. In these States, the viticulture maintains the people in the field. Since 1998 the industry of grape and wine increased the planted area and the demand of juice. But is know that the problem of Santa Catarina is the lack of elite plants with genetic fidelity and high sanitary quality. The objective of this work was to develop methodologies of micropropagation of axillary buds, callogenesis/organogenesis and somatic embryogenesis of rootstocks Paulsen 1103 and VR043-43 and cultivar Cabernet Sauvignon *in vitro*. The methodologie of axillary buds, without plant growth regulators is appropriate to propagation *in vitro* and conservation of germoplasm. However, callogenesis and organogenesis, from leaves, didn't showed good results on the formation of buds, shoots and roots. Somatic embryogenesis to Cabernet Sauvignon related callus with embriogenic aspect, but the others levels of somatic embryogenesis wasn't possible. Paulsen 1103 behaved as generalist in the rich culture medium. However VR 043-43 and Cabernet Sauvignon behaved as selectives in he soft médium. The results of three reports showed genotipics differences *in vitro* to the three cultivars appraised.

# 1. INTRODUÇÃO

As videiras, como são conhecidas popularmente, pertencem ao gênero *Vitis*, família *Vitaceae* (*Ampelidaceae*). A família *Vitaceae* compreende 19 gêneros e mais de 1000 espécies, que habitam principalmente regiões tropicais e subtropicais do globo, e também as regiões de clima temperado, onde, se localiza a maioria dos vinhedos cultivados. O gênero *Vitis*, o único de importância econômica, conta com 108 espécies, sendo 34 norte-americanas, 29 asiáticas e duas indo-europeias, além de 28 espécies fósseis e 15 espécies duvidosas. As principais espécies cultivadas são: *Vitis vinifera*, *V. rotundifolia*, *V. rupestris*, *V. aestivalis*, *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. cinerea*, *V. amurensis*, *V. berlandieri*, *V. candicans*, *V. caribaea*, *V. champinii*, *V. lincecumii*, *V. munsoniana*, (Sousa & Martins, 2002).

Há dois milhões de anos já coexistiam as uvas e o homem que as podia colher (Johnson, 1989). O cultivo da videira está ligado ao homem pela história, pelas religiões e, especialmente no ocidente, pela colonização das Américas, da África e da Austrália. É a frutífera que ocupa a segunda maior área cultivada, com mais de sete milhões de hectares distribuídos em todos os continentes (ICEPA-SC, 2004).

As primeiras mudas de videira (*Vitis vinifera*) foram trazidas ao Brasil em 1532, por Martin Afonso de Souza e, em 1540, os colonizadores portugueses, implantaram pequenos plantios na Capitania de São Vicente, como meio de assegurar a posse da terra. Os primeiros plantios comerciais foram realizados por Brás Cubas em 1551, na região de Tatuapé, atual Estado de São Paulo. Com o passar do tempo, outros pontos do Brasil passaram a cultivar a videira, mas esta não se constituiu em uma cultura de relevante importância, principalmente em razão da falta de adaptação das variedades europeias às condições ambientais brasileiras (Corrêa & Boliani, 2001). Entre 1830 e 1840 foram trazidas para o Brasil as primeiras videiras americanas, de maior resistência a doenças e pragas e com acentuadas características de adaptação ao ambiente brasileiro, onde prosperaram e, desde logo se expandiram (Martins, 2005).

A viticultura é uma atividade econômica recente no Brasil, quando comparada aos tradicionais países produtores da Europa, o que não desmerece

seu valor, pois hoje é uma atividade consolidada e de grande importância sócio-econômica para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

O déficit do balanço comercial de uvas, vinhos e derivados somou 30,8 milhões de dólares em 2002, reduzindo para 19,6 milhões de dólares em 2003. Hoje, o Brasil está se preparando para ingressar em novos mercados exteriores, principalmente com uvas finas e vinhos, entretanto, vem aumentando novamente o déficit comercial para 38,2 milhões de dólares, decorrente do aumento das importações de vinhos (Mello, 2004).

No ano de 2004, a produção brasileira de uvas, segundo Mello (2004), foi de 1,2 milhões de toneladas. O Estado do Rio Grande do Sul tem participação superior a 50% da produção nacional e o Estado de Santa Catarina responde por 4%; mesmo assim ainda é o segundo produtor nacional de vinhos e mosto. Neste mesmo ano, a área colhida de uvas no Estado de Santa Catarina foi de quatro mil ha e a produção obtida de 45 mil toneladas.

Nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina estão envolvidas aproximadamente 18 mil famílias, com geração de 320 mil empregos diretos, nos 40,6 mil ha ocupados com a atividade. Historicamente a viticultura se constitui numa exploração agrícola fixadora do homem ao campo, caracterizando-se pela produção familiar, com o emprego intensivo de mão-de-obra, gerando renda elevada com a utilização de pequenas áreas (Rosier & Losso, 1997; Desplobins, 2001).

Nos últimos anos, precisamente na década de 90, observou-se em Santa Catarina, uma considerável queda na produtividade dos vinhedos e uma forte redução da área plantada (ICEPA-SC, 1986; 1995; Rosier & Losso, 1997). As principais causas foram relacionadas a uma menor rentabilidade no mercado de frutas, baixa produtividade em função de viroses presentes na maioria dos vinhedos e, principalmente, o declínio e morte de plantas, causados pelo ataque de patógenos do solo (Gallotti, 1991; Gallotti & Schuck, 1991, Schuck *et al.*, 1993; Rosier & Losso, 1997; ICEPA, 2001).

A partir de 1998, houve um aumento da área plantada e da demanda de uva, tanto para vinho quanto para mesa e suco. Verificou-se nas principais regiões vitícolas catarinense, como o Vale do Rio do Peixe e Carbonífera, com destaque para as novas áreas em expansão nas Regiões de Altitudes (São Joaquim, Campos Novos e Água Doce), o Oeste (Mondai) e Litoral (Nova Trento),

que as transformações no setor estão ocorrendo de forma rápida, principalmente com o aumento de consumo de vinhos finos e derivados de variedades nobres (*Vitis vinífera*).

Esta evolução do setor é o resultado da ação da indústria vitivinícola, que vem apostando na valorização da qualidade dos vinhos, no aumento do consumo com a urbanização do país e o no surgimento de novos consumidores mais sensíveis aos produtos de qualidade superior. O empenho para o desenvolvimento de vinhos varietais no Estado do Rio Grande do Sul, associando a imagem do vinho fino à região de produção (IGP – Indicação Geográfica de Procedência), traduziu-se por um grande aumento da área plantada com variedades viníferas no Planalto Catarinense.

Assim, a área de produção tem sofrido um acréscimo acentuado com a renovação dos vinhedos e novos plantios. A ampliação dos vinhedos com mudas importadas busca melhorar a qualidade e fazer concorrência aos vinhos importados.

Devido à falta de mudas e principalmente a baixa qualidade destas, tem-se verificado uma busca crescente para a importação de matrizes e mudas certificadas, originárias dos países europeus, principalmente Itália e França.

Então, verifica-se de forma acentuada que o grande problema do setor vitícola, é a falta de mudas ofertadas aos produtores com garantia de qualidade, principalmente livres de doenças e pragas, com destaque para os problemas causados pelas viroses.

Este novo cenário exigiu uma grande demanda de material vegetativo para multiplicação e produção de mudas, principalmente de qualidade genética e sanitária comprovada (Moreira, 2000).

As pesquisas realizadas com videira no Estado de Santa Catarina estão cada vez mais seguindo metodologias aprofundadas (celular e molecular). Em termos gerais, estas tecnologias permitem, por exemplo, propagar em larga escala plantas de qualidade genética e sanitária superior (milhares), sem destruir a planta-mãe; obter plantas fáceis de transportar, sem preocupações com introdução de novas doenças ou ainda, recuperar espécies em vias de extinção. As potencialidades da cultura de tecidos têm sido exploradas para criar variação genética (somaclonal) permitindo obter indivíduos resistentes a fatores de estresse, biótico ou abiótico, ou com características melhoradas (Oliveira, 2000).

Deste modo foram selecionadas as três variedades para a execução deste trabalho: Paulsen 1103 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*), porta-enxerto que apresenta resistência a Fusariose, VR 043-43 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*), porta-enxerto que apresenta resistência a Fusariose e tolerância a Margarodes e Cabernet Sauvignon, uma das variedades viníferas de maior interesse para plantio no Brasil, devido a excelente qualidade dos vinhos produzidos.

Os experimentos tiveram a finalidade de estudar três métodos de propagação *in vitro*: desenvolvimento de brotações através de gemas axilares, calogênese/organogênese e embriogênese somática. Estes trabalhos visaram contribuir para o desenvolvimento de protocolos de multiplicação em larga escala, meios de cultura adequados, utilização de órgãos (calos, brotos, raízes) e embriões somáticos em estudos de fisiologia e técnicas de melhoramento vegetal.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Propagação da videira

O domínio das técnicas de propagação é um importante passo no sucesso da implantação de um vinhedo. Para a multiplicação e perpetuação de genótipos superiores da videira, o homem tem utilizado geralmente métodos tradicionais de propagação vegetativa, usando estacas caulinares do porta-enxerto (estaquia) e o enxerto de variedades produtoras (enxertia) a campo ou em viveiro. (Chalfun *et al.*, 1992).

A utilização de estacas lenhosas é bastante difundida, pelo fato de essas apresentarem alta taxa de pegamento (Fachinello *et al.*, 1994). Segundo Simão (1971) o comprimento dessas estacas, normalmente, é em torno de 30 a 60 cm. Por outro lado, Chalfun *et al.* (1992), utilizando estacas com duas gemas e comprimento de 12 cm, obtiveram taxas de enraizamento similares a estacas de tamanho convencional. A utilização de estacas de tamanho reduzido tem a grande vantagem de proporcionar melhor aproveitamento dos propágulos, além da possibilidade de obtenção de mudas precoces, em sistemas intensivos de produção (Chalfun, *et al.*, 1992).

Muito são os trabalhos que visam otimizar a propagação vegetativa da videira, mas algumas variedades são consideradas recalcitrantes, quer pela capacidade de brotação, quer pela capacidade de enraizamento. As estacas lenhosas apresentam bons resultados de enraizamento para a maioria dos porta-enxertos, entretanto o enraizamento das variedades Muscadinias (*Vitis rotundifolia*) apresenta grande dificuldade para a propagação por meio de estacas lenhosas, sendo mais viável o enraizamento de estacas herbáceas em câmaras de nebulização (Pires & Biasi, 2003).

Porém, os métodos de estaquia e enxertia apresentam outros problemas que são inerentes ao processo, como número limitado de plantas produzidas, maior tempo e mão-de-obra requeridos, fatos que elevam assim o custo de produção, além de apresentar um maior risco de transmissão de patógenos, principalmente as viroses (Pires & Biasi, 2003).

Com as técnicas de propagação e multiplicação *in vitro* obtém-se uma taxa de produção muito superior, atingindo milhares de plantas sadias e homogêneas, originadas a partir de um único explante, em um curto período de tempo e em um espaço físico reduzido, além de permitir o trabalho durante todo o ano (Peixoto & Pascal, 1994; Lima da Silva, 1995; Borghezan *et al.*, 2003). As técnicas de cultura *in vitro* também podem ser utilizadas como importante instrumento para estudos de fisiologia e melhoramento genético vegetal, principalmente com relação à conservação dos recursos genéticos (Galzy *et al.*, 1990; Péros *et al.*, 1998; Mhatre *et al.*, 2000; Moreira, 2000; Burkhardt, 2001; Borghezan, *et al.*, 2003), e mais recentemente com a tecnologia do DNA recombinante (Baribauld *et al.*, 1989; Torregrosa *et al.*, 1994; Perl & Eshdat, 1998; Iocco *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004).

## **2.2. Propagação *in vitro* da videira**

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto (Grattapaglia & Machado, 1998).

As técnicas de cultura *in vitro* têm demonstrado grande potencial para a propagação de plantas de *Vitis* (Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991; Torregrosa & Bouquet, 1995; Silva *et al.*, 1997; Biasi *et al.*, 1998; Mhatre *et al.*, 2000; Borghezan, *et al.*, 2003). A micropropagação das videiras consiste basicamente no processo de enraizamento de brotações axilares ou adventícias multiplicadas *in vitro*, para a regeneração de plantas inteiras. Esse processo possibilita a rápida multiplicação de plantas, a obtenção de plantas-matrizes livres de vírus através de técnicas de limpeza viral, a propagação de híbridos e a preservação de germoplasma de interesse (Krul & Mowbray, 1984). Os explantes normalmente utilizados são segmentos nodais (Gribaudo & Fronda, 1991), ápices meristemáticos (Chée & Pool, 1982; Yu & Meredith, 1986) e meristemas (Passos *et al.*, 1985; Troncoso *et al.*, 1988; Koruza & Jelaska, 1993; Borghezan *et al.*, 2003).

O primeiro relato da micropropagação da videira foi feito por Galzy, em 1961 onde obteve plantas inteiras a partir de microestacas (segmentos nodais).

Mais tarde, a indução da proliferação de gemas mostrou-se uma rota alternativa para a micropropagação (Jona & Webb, 1978).

A maioria dos sistemas de micropropagação envolve o isolamento de órgãos meristemáticos pré-formados, as gemas axilares, e a quebra de dominância apical com a aplicação de giberelina e/ou citocinina exógena. As gemas axilares que naturalmente se formam nas inserções das folhas são estimuladas a crescer, dando origem a novas partes aéreas, que, por sua vez, repetem o mesmo processo (Grattapaglia & Machado, 1998).

Para a propagação *in vitro* da videira a metodologia mais utilizada é a “multiplicação de gemas axilares” desenvolvida por Mme Galzy a partir dos anos 60 na ENSAM – École Nationale Supérieure de l'Agriculture de Montpellier (França) que permite manter e multiplicar *in vitro* clones de videira por tempo indeterminado através de repicagens sucessivas (Galzy, 1985).

Embora o uso de ápices e gemas axilares para a propagação *in vitro* de diversas espécies e variedades de *Vitis* esteja documentado (Gray & Ficher, 1985) e protocolos de micropropagação estabelecidos para as videiras do grupo Muscadinia (Thies & Graves, 1992; Torregrosa & Bouquet, 1995) estudos com algumas variedades de *Vitis vinifera* L. tem apresentado resultados insatisfatórios (Chee & Pool, 1983; Zatiko & Molnar 1985; Mhatre *et al.*, 2000).

Dentre muitos fatores que influenciam o sucesso de uma prática, o meio de cultura, reguladores de crescimento e as condições de incubação estão entre os principais.

São diversos os meios de cultura utilizados para a propagação da videira, entre eles: NN – Nitsch & Nitsch (1969); MS - Murashige & Skoog (1962); Chée & Pool (1985 e 1987); Galzy *et al.* (1990) e suas modificações (Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991; Lima da Silva & Doazan, 1995); Zlenko *et al.* 1995; Torregrosa *et al.* 1995).

Diversos são os reguladores de crescimento utilizados na cultura *in vitro* da videira, entre eles, o principal é a citocinina BAP (6-benzilaminopurina) em concentrações que variam de 2,2 a 8,8  $\mu\text{mol}$  (Peixoto & Pasqual, 1992) e a auxina ANA (ácido naftalenoacético). Muitos autores, como Galzy (1985) e Bouquet (1989), salientam que a presença de reguladores de crescimento no meio de cultura pode levar a instabilidade genética, como mudanças de ploidias e rearranjo cromossômico.

Lima da Silva & Doazan (1995) e Lima da Silva (1995), trabalhando com porta-enxertos de videira, desenvolveram meios de cultura sem a adição de reguladores de crescimento, a fim de eliminar possíveis distúrbios genéticos. O meio DSD1 (Lima da Silva & Doazan, 1995), tem sido utilizado com sucesso na propagação *in vitro* de diferentes variedades de videiras (Moreira, 2000; Burkhardt, 2001; Borghezani *et al.*, 2003).

O potencial de multiplicação *in vitro* da videira é elevado, com estimativas anuais de 2.808.990 brotações da variedade Thompson Seedless, 26.494 brotações da Ribier e 1.213 da Black Seedless em meio MS com 8,8 µmol de BAP, a partir de um explante (Botti *et al.*, 1993). Harris & Stevenson (1982) estabeleceram um protocolo capaz de produzir 12.000 brotações em quatro meses a partir de apenas um ápice meristemático. Na cultura de ápices fragmentados, Barlass & Skene (1978) estimaram a produção de aproximadamente 8.000 plantas da variedade Cabernet Sauvignon em quatro meses, também a partir de apenas um ápice. Lewandowski (1991) obteve cerca de 3.000 plantas de videira Delaware por mês, utilizando um meio MS modificado e reduzindo os intervalos de repicagem, mas ressaltou a importância de novos isolamentos anualmente, em combinação com uma proliferação limitada de brotações, para reduzir o risco da variação somaclonal.

Outras técnicas de micropropagação tem sido muito pesquisadas para a videira, como a multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta (formação de calos) e a multiplicação via embriogênese somática.

### **2.3. Organogênese**

A organogênese relaciona-se com a obtenção de eixos caulinares monopolares originados de gemas pré-existentes ou neoformadas (Guerra *et al.*, 2005).

Dentre os diferentes modelos organogenéticos conhecidos, a indução e proliferação de gemas, e posterior brotações adventícias resultam nas maiores taxas de multiplicação. Consiste na formação direta ou indireta de meristemóides a partir de discos foliares, ápices caulinares ou radiculares, segmentos caulinares nodais e internodais, cotilédones, hipocótilos e outras estruturas de plântulas,

segmentos de flores, inflorescências imaturas e escamas de bulbos (tecidos meristemáticos na placa basal) (Guerra *et al.*, 2005). As gemas adventícias são formadas em locais incomuns, diferentes daqueles onde se formam no curso normal de desenvolvimento da planta. A sua formação ocorre de maneira direta ou indireta (Grattapaglia & Machado, 1998).

A organogênese direta refere-se à formação direta de gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogenético na planta *in vivo*, mas que, em geral, não se expressa (Grattapaglia & Machado, 1998).

A organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo, que pode ser definido como a proliferação de células não diferenciadas, originando meristemóides (Thorpe, 1980). A partir de células não organizadas do calo, são formadas gemas adventícias que crescem e se desenvolvem em novas partes aéreas (Grattapaglia & Machado, 1998).

Os eventos organogenéticos ocorrem mediante a desdiferenciação e posterior rediferenciação das células, dependendo da retomada da atividade meristemática em células maduras diferenciadas ou em um tecido calogênico diferenciado (Alves *et al.*, 2004). O processo de organogênese *in vitro* depende da interação de fatores internos e externos, tais como: fonte de explante, meio de cultura e fatores do ambiente (George, 1993; Pierik, 1997; Joy Iv & Thorpe, 1999).

A possibilidade de manipulação da organogênese depende também do tipo e concentração relativa dos reguladores de crescimento, como indicado pelo já clássico trabalho de Skoog & Miller (1957). Estes autores observaram que a relação entre a auxina e a citocinina no meio de cultura era responsável pela resposta organogenética em tecidos medulares de tabaco. Desta forma, meios de cultura contendo concentrações mais elevadas de citocininas promoviam a formação de brotações aéreas ou eixos caulinares; meios de cultura contendo níveis mais elevados de auxinas induziam a formação de raízes e, em concentrações equimolares destes reguladores de crescimento verificava-se a formação de calos (Guerra *et al.*, 2005).

Outro fator importante no processo de organogênese é a habilidade do tecido em responder às mudanças hormonais durante o período de cultivo (Sugiyama, 1999). A maneira complexa com que os reguladores de crescimento e

as células interagem indica que, se o tecido não está em um estágio responsivo, este não irá responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações esses reguladores são utilizados. Ausência na resposta a um regulador de crescimento é freqüentemente um problema maior quando explantes de plantas adultas são utilizados, em comparação com material juvenil (Bonga & Von Aderkas, 1992).

Em macieira, trabalhos mostram que BAP é essencial para a indução de brotações (Dunstan *et al.*, 1985; Arelló *et al.*, 1989). Pasqual & Ishida (1992) obtiveram os melhores resultados para o número total de brotos e número de brotos maiores que 10mm do porta-enxerto de macieira MI-793, com 2,2  $\mu\text{mol}$  de BAP. Yui *et al.* (1993) obtiveram maior número de brotos do porta-enxerto M7, mais longos que 1,0 cm, usando BAP em concentrações entre 2,2 - 8,8  $\mu\text{mol}$ . Para Ding & Wang (1996), a suplementação do meio com BAP em concentrações até 22,2  $\mu\text{mol}$  é um fator importante para a regeneração de brotos adventícios em explantes de macieira.

O thidiazuron (TDZ) também tem sido usado na organogênese *in vitro* pois, segundo Huetteman & Preece (1993), é um excelente estimulante para formação de calos em concentrações iguais ou maiores que 1,0  $\mu\text{mol}$ . Sarwar & Skirvin (1997) obtiveram a máxima regeneração de brotos adventícios em segmentos de folhas de macieira, utilizando entre 2 e 3  $\mu\text{mol}$  de TDZ. Entretanto, tem como inconveniente, conforme Virscek *et al.* (1994), a ocorrência de altas taxas de vitrificação quando presente em meio de proliferação. Caboni *et al.* (1996) verificaram que a combinação de ANA com TDZ resultou em um alto percentual de regeneração de brotos do porta-enxerto Jork 9, porém com alta incidência de plantas vitrificadas.

Em Vitaceae, a formação de calos e raízes *in vitro* foi relatada por Morel (1944), Fallot (1954), Pelet *et al.* (1959) e Galzy (1969), mas a primeira menção sobre formação de gemas adventícias foi feita por Favre (1977), onde as plantas foram regeneradas a partir de tecidos foliares de uma variedade pouco conhecida de *V. vinifera*, Prodigiosa (Bicane X Poéte Matabon). Ainda em 1981, Rajasekaran & Mullins apresentaram um protocolo para regeneração de videira utilizando organogênese adventícia.

Stamp *et al.* (1990), relataram a formação de brotações adventícias, utilizando pecíolo e lâmina foliar como fontes de explantes, para as variedades

Cabernet Sauvignon, French Colombard, Grenache e Thompson Seedless. As diferenças entre as porcentagens de regeneração variaram de 14% a 67% dependendo da variedade.

Péros *et al.* (1998), através de estudos de organogênese utilizando 20 variedades de *Vitis vinifera*, obtiveram 36,7% de regeneração de brotações adventícias a partir de lâminas foliares. Constataram também uma grande diferença de regeneração entre as variedades.

Os reguladores de crescimento mais utilizados para a indução de organogênese em videira são BAP e ANA (Favre, 1977; Rajasekaran & Mullins, 1981, Martinelli *et al.*, 1996; Péros *et al.*, 1998), mas também foram utilizadas combinações de BAP e AIB (ácido indolbutírico) (Cheng & Reisch, 1989; Favre, 1977) e ANA e KIN (cinetina) (Favre, 1977).

#### **2.4. Embriogênese somática**

Embriogênese somática ou adventícia são termos usualmente empregados para designar o processo pelo qual células somáticas ou haplóides desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (Williams & Maheswaran, 1986).

Barros (1999) ressalta que dentre os processos de micropropagação, a embriogênese somática é, teoricamente, a melhor opção para a propagação *in vitro* de fruteiras por apresentar algumas vantagens, tais como: alta taxa de multiplicação comparada a qualquer outro processo de propagação; escalonamento da produção pela manutenção da cultura em meio líquido e semi-sólido; menor custo de produção, além de a planta ser geneticamente igual à planta-mãe. Yeung, 1995 relata a embriogênese somática como uma estratégia para os estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião, e também Guerra *et al.* (1998) ressaltam a importância da embriogênese somática para a propagação de plantas elite *in vitro*, em larga escala. O sistema também tem sido utilizado para produção de plantas transgênicas (Prakash & Varadarajan, 1992; Gama, 1993) e sementes sintéticas (Schultheis *et al.*, 1990).

A embriogênese somática pode ser expressa sob dois padrões: um modelo direto, onde os embriões se originam dos tecidos matrizes sem a formação de estágio intermediários de calos e um modelo indireto, onde há formação de um

tecido intermediário. Este tecido, ou calo apresenta células em diversos estádios de diferenciação e, conseqüentemente com diferentes graus de determinação, as quais podem adquirir novas competências mediadas por mensageiros químicos específicos (Guerra *et al.*, 1998). Hartman & Kester (1983) afirmam que o calo é produzido nos explantes cultivados *in vitro* como resultado do ferimento ocorrido por ocasião da dissecação do tecido e em resposta a reguladores do crescimento endógenos ou supridos pelo meio de cultura.

Segundo Pasqual (1985), teoricamente, qualquer parte da planta pode ser utilizada para iniciar a cultura de tecidos, porém, melhores resultados são alcançados com tecido mais jovens e ativos, que são prontamente estimulados e tem maior potencial morfogênético.

Independentemente do padrão direto ou indireto, as células-mãe embriogênicas apresentam um conjunto de características comuns ao comportamento de células embrionárias em divisão ativa. Estas características incluem o tamanho pequeno (100 – 200µm), conteúdo citoplasmático denso, núcleos grandes com nucléolos proeminentes, vacúolos pequenos com presença de grãos de amido. As propriedades histoquímicas sugerem intensa atividade metabólica e de síntese de RNA (Tisserat *et al.*, 1979; Sharp *et al.*, 1980; Vasil, 1982 *apud* Guerra *et al.*, 1998).

Dentre os meios de cultura mais utilizados para a embriogênese somática em videira, Murashige & Skoog (1962), sua modificação Torregrosa (1998) e Nitsch & Nitsch, (1969), destacam-se pelos resultados satisfatórios em relação a outros meios.

Para a desdiferenciação de células somáticas, é necessário a adição de reguladores de crescimento no meio de cultura e os mais utilizados são: 2,4-D (2,4-diclorofenóxiacético), TDZ – Thidiazuron [1-phenyl-3-(1,2,3-thidiazol-5-yl)-urea], ANA (ácido naftaleno acético), NOA (ácido naftoxiacético) e BAP (6-benzilaminopurina). Estes reguladores, geralmente são utilizados em concentrações maiores que as utilizadas para a micropropagação convencional e estas dependem da espécie e/ou variedade estudada. Dentre as auxinas, o 2,4 – D tem sido reportado como o regulador de crescimento sintético mais adequado à indução e manutenção de calos para as mais diversas espécies vegetais cultivadas *in vitro* (Gamborg *et al.*, 1976). Guerra *et al.* (1998) relatam que as citocininas podem favorecer a produção de calos embriogênicos (Chée &



Cantliffe, 1988) e que baixas concentrações da mesma foram necessárias para a embriogênese somática na maioria das culturas de células de dicotiledôneas (Schenk & Hildebrandt, 1972).

A técnica de embriogênese somática foi descrita pela primeira vez por Steward *et al.* (1958) e Reinert (1958) em cenoura (Guerra *et al.*, 1998). Segundo Salunkhe *et al.* (1999), a embriogênese somática em videira foi relatada pela primeira vez utilizando tecido nucelar de *Vitis vinifera* L. cv “Cabernet-Sauvignon” (Mullins & Srinivasan, 1976) e depois disso vários explantes foram usados: folhas (Robacker, 1993), embriões zigóticos (Emershad & Ramming, 1994), ovários (Gray & Mortesen, 1987), ápice caulinar (Barlass & Skene, 1978) e anteras (Popescu, 1996).

Martinelli *et al.* (2001) relatam que o primeiro plantio comercial de videiras a partir de embriões somáticos foi estabelecida em meados de 1977 (*Vitis* sp. Cv. Seyval, Maryland, USA; Krul & Mowbray, 1984), e em 1985 um protocolo para embriogênese somática foi patenteado nos Estados Unidos (Krul, 1985). Desde então a técnica tem sido significativamente melhorada para diversos genótipos e a partir de vários explantes.

No caso da videira a eficiência de 2,4-D na produção de calos é citada por diversos autores como Matsuta, 1992; Robacker, 1993; Popescu *et al.*, 1995; Viczián & Mozsár, 1996; Torregrosa, 1998; Jayasankar *et al.*, 1999; Perrin *et al.*, 2001; Das *et al.*, 2002.

Estudos de embriogênese somática, realizados por Martinelli *et al.* (1993), utilizando folhas e pecíolos de *Vitis rupestris* como fontes de explantes, relataram que um balanço entre citocinina/auxina  $1/1\text{mg.l}^{-1}$  induziram um índice considerável de embriões somáticos. Robacker (1993) relatou que a combinação de 2,4-D (9  $\mu\text{mol}$ ) e BAP (4,4  $\mu\text{mol}$ ) induziu calos em explantes foliares de videiras do grupo Muscadinia.

Salunkhe *et al.* (1999) obtiveram embriões somáticos de *Vitis latifolia* L. a partir de calos de anteras uninucleadas utilizando meio de cultura isento de reguladores de crescimento, com rendimento de até 400 embriões/g de calo embriogênico. No mesmo trabalho, o autor relata a regeneração de plantas em 13,7% dos embriões obtidos.

Estudos realizados por Stamp & Meredith (1988), utilizando meio sólido Nitsch & Nitsch (1969) acrescidos de 5  $\mu\text{mol}$  de NOA e 1  $\mu\text{mol}$  de BAP, obtiveram

incidência de embriogênese somática para *Vitis longii* Prince e *Vitis vinifera* L. variedades 'Chardonnay, French Colombard e Grenache'.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Desenvolver metodologias de propagação *in vitro* através de gemas axilares, organogênese, e embriogênese somática para as variedades de videira Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Definir protocolo básico para a propagação *in vitro* da videira, variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon;
- Determinar o(s) meio(s) de cultura que possibilitem o melhor desenvolvimento das variedades em estudo;
- Determinar tipos de explantes e meios de cultura que possibilitem a proliferação celular *in vitro* das variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon;
- Determinar a melhor fonte de explantes para a indução de calos embriogênicos;
- Determinar as melhores combinações e concentrações de reguladores de crescimento (auxinas e citocininas) na proliferação e multiplicação *in vitro*.
- Estabelecer diferenças morfogênicas *in vitro* entre as três variedades.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal – LMBV - do Centro de Ciências Agrárias – CCA - da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Foram realizados experimentos, buscando diferentes rotas de proliferação celular e multiplicação *in vitro* de plantas em larga escala das variedades Paulsen 1103 (*Vitis. berlandieri* x *V. rupestris*), VR 043-43 (*V. vinifera* x *V. rotundifolia*) e Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.). Além disso, foi avaliado o desenvolvimento das três variedades em diferentes meios de cultura, ME (Torregrosa, 1998) (ANEXO 1), DSD1 (Lima da Silva & Doazan, 1995) (ANEXO 2) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968) (ANEXO 3).

### 4.1. Desenvolvimento *in vitro* de brotações através de gemas axilares

#### 4.1.1. Material vegetal

Os explantes utilizados foram coletados de plantas *in vitro* do Banco de Germoplasma do LMBV. Foram utilizados segmentos nodais de aproximadamente 1 cm de comprimento, contendo uma gema axilar, provenientes de plantas com 60 dias de cultura *in vitro*.

#### 4.1.2. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram:

- ❖ **ME:** constituído de metade da concentração de macronutrientes de MS, micronutrientes de MS, 37,25 mg.l<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>EDTA . 2H<sub>2</sub>O, 27,85 mg.l<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O, 1,0 ml.l<sup>-1</sup> de vitaminas de Morel & Martin (1952), 10 mg.l<sup>-1</sup> de fenilalanina, 2,0 mg.l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg.l<sup>-1</sup> de glutamina e 1,0 g.l<sup>-1</sup> de caseína hidrolisada, suplementado com 30 g.l<sup>-1</sup> de sacarose, isento de reguladores de crescimento. O pH foi aferido em 6,0 antes da adição de 6,0 g.l<sup>-1</sup> de agar-agar. Após, o meio ME foi autoclavado a 121°C a 1 atm durante 20 minutos.
- ❖ **B5:** constituído de macro e micronutrientes de B5, 37,25 mg.l<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>EDTA . 2H<sub>2</sub>O, 27,85 mg.l<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O, 1,0 ml.l<sup>-1</sup> de vitaminas

de B5, suplementado com 20 g.l<sup>-1</sup> de sacarose, isento de reguladores de crescimento. O pH foi aferido em 5,5 antes da adição de 6,0 g.l<sup>-1</sup> de agar-agar. Após, o meio B5 foi autoclavado a 121°C a 1 atm durante 20 minutos.

- ❖ **DSD1**: constituído de macro e microelementos de DSD1, 37,50 mg.l<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>EDTA . 2H<sub>2</sub>O, 27,50 mg.l<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O, 1,0 ml.l<sup>-1</sup> de vitaminas de DSD1, suplementado com 20 g.l<sup>-1</sup> de sacarose, isento de reguladores de crescimento. O pH foi aferido em 6,3 antes da adição de 6,0 g.l<sup>-1</sup> de agar-agar. Após, o meio DSD1 foi autoclavado a 121°C a 1 atm durante 20 minutos.

Foram utilizados tubos de ensaio Pyrex® (22 X 220 mm) contendo 10 ml de meio de cultura. Em câmara de fluxo laminar foi inoculado um segmento nodal contendo uma gema axilar por tubo de ensaio, e estes foram fechados hermeticamente com tampas transparentes e filme de PVC.

Posteriormente, foram transferidos para a sala de cultura e mantidos durante 60 dias em temperatura de 25±1°C, com fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa incidente de 40 – 45 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, ao nível dos tubos. A umidade relativa da sala de cultura variou de 60 – 70%.

#### 4.1.3. Avaliação Morfológica

Após 60 dias de cultura foram analisados dados referentes ao comprimento do caule e da raiz mais longa, número de folhas e raízes primárias, e biomassa seca (mg) dos diferentes órgãos vegetais da planta (folhas, caule e raízes).

O comprimento do caule e da raiz foi determinado com a ajuda de um paquímetro. Cada parte da planta foi isolada e pesada separadamente com uma balança de precisão Kern 430-21. Em seguida, os órgãos foram desidratados em estufa a 60°C por 48 horas. Ao final deste período, as diferentes partes da planta foram pesadas para determinação da biomassa seca.

Para todos os parâmetros estudados foram utilizadas cinco repetições. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de separação de médias Duncan 5% com auxílio do software STATISTICA®.

## 4.2. Calogênese e Organogênese

### 4.2.1. Material vegetal

Como fonte de explante, foram utilizadas folhas sem pecíolo provenientes de plantas com 60 dias de cultura *in vitro* do Banco de Germoplasma do LMBV.

### 4.2.2. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram:

- ❖ **ME:** (Torregrosa, 1998), conforme item 4.1.2. Ao meio de cultura foram adicionados os reguladores de crescimento TDZ/ANA ou BAP/ANA nas seguintes concentrações 5,0/0,2; 10,0/0,2 ou 20,0/0,2  $\mu\text{mol}$ .
- ❖ **B5** (Gamborg *et al.*, 1968), conforme item 4.1.2. Ao meio de cultura foram adicionados os reguladores de crescimento TDZ/ANA ou BAP/ANA nas seguintes concentrações 5,0/0,2; 10,0/0,2 ou 20,0/0,2  $\mu\text{mol}$ .

### 4.2.3. Procedimento

Foram utilizados frascos de vidro (70 X 130 mm) contendo 50 ml de meio de cultura. Em câmara de fluxo laminar foram inoculadas duas folhas por frasco de vidro, e estes foram fechados hermeticamente com tampas transparentes e filme de PVC. Em cada folha foram feitos três pequenos cortes, a fim de facilitar o contato entre as nervuras e o meio de cultura.

Posteriormente, foram transferidos para a sala de cultura e mantidos durante 30 dias em temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa incidente de  $40 - 45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , ao nível dos vidros. A umidade relativa da sala de cultura variou de 60 – 70%.

Os tratamentos foram nomeados por uma sigla contendo o meio de cultura e a concentração de citocinina: ME BAP 5, ME BAP 10, ME BAP 20, ME TDZ 5, ME TDZ 10 e ME TDZ 20; B5 BAP 5, B5 BAP 10, B5 BAP 20, B5 TDZ 5, B5 TDZ 10 e B5 TDZ 20.

#### 4.2.4. Avaliação

Após 30 dias, foi registrado a presença de proliferação celular (calos), coletados dados sobre o aspecto geral dos calos formados (textura e coloração) e a formação de brotações adventícias. Esta avaliação segue a metodologia utilizada por Alves *et al.* (2004). Para o cálculo das médias de coloração e textura, foram considerados apenas os explantes que formaram calos.

A textura - coesão entre as células que formam o calo - foi avaliada em friável (células levemente ligadas); compacta (células firmemente ligadas) e texturas intermediárias, classificadas como semifriável e semi-compacta.

Em relação às colorações avaliadas na fase de indução de calos, foram classificadas como claras (branco e bege-claro) e escuras (bege-escuro e amarronzadas). O bege-escuro refere-se aos calos de cor escura, mas que não estão oxidados, e os calos amarronzados, referem-se aos calos oxidados.

Cada frasco de vidro foi considerado uma unidade amostral, contendo dois explantes, cada tratamento foi constituído por cinco repetições. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Para comparação dos resultados, foram calculados, as médias e desvios padrões das variáveis por tratamento.

### **4.3. Indução da Embriogênese Somática**

#### 4.3.1. Material vegetal

Os explantes utilizados para a indução dos calos embriogênicos foram coletados de plantas *in vitro* com 60 dias de cultura do Banco de Germoplasma do LMBV. Foram utilizados dois tipos de explantes: disco foliar e pecíolo, seccionados em tamanhos de aproximadamente 25 mm<sup>2</sup> e 4 mm, respectivamente. Estes explantes eram provenientes das folhas da parte mediana das plantas, ou seja, foram ignoradas as três primeiras e as três últimas folhas.

#### 4.3.2. Meios de cultura

Foram testados dois meios de cultura para indução de calos embriogênicos.

- ❖ **ME** (Torregrosa, 1998), conforme item 4.1.2. Ao meio de cultura foram adicionados os reguladores de crescimento 2,4-D e BAP, nas

concentrações 5,0 e 1,0  $\mu\text{mol}$ , respectivamente. O pH foi aferido em 6,0 antes da adição de 4,0  $\text{g.l}^{-1}$  de agar-agar e 4,0  $\text{g.l}^{-1}$  de Phytigel®. Após, os meios foram autoclavados a 121°C a 1 atm durante 20 minutos.

- ❖ **B5** (Gamborg *et al.*, 1968), conforme item 4.1.2. Ao meio de cultura foram adicionados os reguladores de crescimento 2,4-D e BAP, nas concentrações 5,0 e 1,0  $\mu\text{mol}$ , respectivamente. O pH foi aferido 5,5 antes da adição de 4,0  $\text{g.l}^{-1}$  de agar-agar e 4,0  $\text{g.l}^{-1}$  de Phytigel®. Após, os meios foram autoclavados a 121°C a 1 atm durante 20 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, os meios de cultura foram plaqueados em placas de Petri descartáveis (90x15 mm). Cada placa recebeu 10 ml de meio.

#### 4.3.3. Procedimento

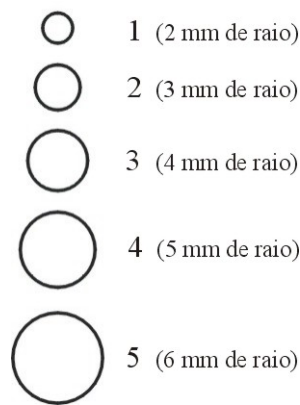
Em câmara de fluxo laminar, foram inoculados seis explantes por placa de Petri. Os discos foliares foram alocados com a face abaxial em contato com o meio de cultura, e os pecíolo foram alocados horizontalmente sobre o meio. As placas contendo os explantes foram mantidas em sala de cultura com temperatura de  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , com total ausência de radiação luminosa. A umidade relativa da sala de cultura variou de 60 – 70%.

#### 4.3.4. Avaliação

Foi realizada uma avaliação quanto à proliferação celular e aspecto geral do calo (textura e coloração). Esta avaliação seguiu a metodologia utilizada por Alves *et al.* (2004). Para o cálculo das médias de coloração e textura, foram considerados apenas os explantes que formaram calos.

O critério adotado na avaliação da proliferação celular foi baseado em uma metodologia elaborada propositadamente para este experimento. Esta consistiu na elaboração de uma escala com cinco círculos de raios de 2 à 6 mm (**Figura 1**). A cada círculo foi definida uma área e atribuída uma nota de 1 à 5 e a área dos calos foi comparada aos círculos. Os calos então receberam a nota do círculo.





**Figura 1.** Metodologia para classificação de proliferação celular quanto à área.

A textura e coloração foram avaliadas conforme o item 4.2.4.

Os calos ainda foram submetidos às análises histoquímicas em dupla coloração com Carmim Acético e Azul de Evans (Gupta & Durzan, 1987) objetivando a visualização da sua morfologia, para a determinação do aspecto embriogênico. A visualização foi realizada em Microscópio Óptico OLYMPUS BX40. Células que reagem fortemente ao corante Carmim Acético e fracamente ao Azul de Evans são embriogênicas, e células com reação fraca ao primeiro e intermediária ao segundo são células não embriogênicas. (Gupta & Durzan, 1987).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Cada placa de Petri, contendo seis explantes, foi considerada uma unidade amostral e cada tratamento foi constituído por seis repetições.

Para comparação dos resultados, foram calculados, as médias e desvios padrões das variáveis por tratamento.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Desenvolvimento *in vitro* de brotações através de gemas axilares

Após 60 dias de cultura *in vitro*, as características morfológicas e produção de massa seca foram avaliadas. Os resultados obtidos por Lima da Silva *et al.* (2000), Moreira (2000) e Borghezani *et al.* (2003), indicaram diferenças significativas entre as variedades e clones de videira relacionadas ao desenvolvimento *in vitro* e produção de biomassa.

A variedade Paulsen 1103 apresentou os melhores resultados (**Tabela 1**), quando comparada às variedades VR 043-43 e Cabernet Sauvignon.

**Tabela 1.** Características morfológicas das variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon após 60 dias de cultura *in vitro* nos meios de cultura ME<sup>(1)</sup>, DSD1<sup>(2)</sup> e B5<sup>(3)</sup>.

Variedades	Meios de cultura	Comp. de caule (cm)	Comp. de raiz (cm)	Nº de raízes primárias	Nº de folhas
Paulsen 1103	ME	6,1 ± 1,6 a	7,3 ± 2,9 a	3,4 ± 2,1 abc	10,0 ± 2,3 a
	DSD1	4,6 ± 0,9 abc	9,9 ± 3,4 a	1,4 ± 0,5 bc	8,2 ± 1,9 ab
	B5	4,9 ± 1,5 ab	8,8 ± 2,2 a	1,6 ± 0,5 bc	7,8 ± 2,7 ab
VR 043-43	DSD1	3,0 ± 1,6 c	3,6 ± 3,0 b	2,2 ± 0,8 abc	5,4 ± 2,6 bc
	B5	1,2 ± 0,1 d	1,0 ± 0,3 b	1,2 ± 0,4 c	1,0 ± 0,0 d
Cabernet Sauvignon	ME	1,2 ± 0,6 d	3,2 ± 1,9 b	4,2 ± 3,1 a	3,2 ± 2,2 cd
	DSD1	4,5 ± 1,0 abc	10,1 ± 2,0 a	3,6 ± 1,9 ab	7,6 ± 1,1 ab
	B5	3,9 ± 1,0 bc	6,9 ± 1,2 a	4,4 ± 1,1 a	6,6 ± 2,2 b

Os valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade; os valores das variáveis são apresentados como média ± desvio padrão.

<sup>(1)</sup>Torregrosa, 1998; <sup>(2)</sup>Lima da Silva & Doazan, 1995; <sup>(3)</sup>Gamborg *et al.*, 1968.

Observou-se que o maior comprimento de caule foi obtido por Paulsen 1103 em meio ME (6,1 cm), mas que não diferiu estatisticamente de Paulsen nos meios DSD1 (4,6 cm) e B5 (4,9 cm) e de Cabernet Sauvignon no meio DSD1 (4,5 cm). O porta-enxerto VR 043-43 apresentou resultados inferiores para o comprimento de caule nos meios de cultura DSD1 e B5. A variedade Cabernet Sauvignon apresentou melhor crescimento no meio DSD1, não diferindo do meio B5. Moreira (2000), avaliando o Paulsen 1103 em meio DSD1, observou valor de

comprimento de caule semelhante ao obtido em meio ME, mas superior ao meio DSD1 deste trabalho. Com exceção de VR 043-43 nos dois meios de cultura em que foi avaliado e Cabernet Sauvignon em ME, os outros tratamentos proporcionaram valores superiores aos trabalhos de Zlenko *et al.* (1995) que avaliaram o desenvolvimento *in vitro* do porta-enxerto Kober 5BB e os híbridos interespecíficos Podarok Magaracha e Zhemchug Magaracha, em meio de cultura MS/2 (Murashige & Skoog, 1962). Já Torregrosa & Bouquet (1995) obtiveram comprimento de caule do porta-enxerto Fercal em meio MS/2 superior à todas os valores obtidos neste experimento.

Dois grupos foram formados quando observados os comprimentos das raízes mais longas. O primeiro grupo, apresenta a Cabernet Sauvignon com um maior comprimento em meio DSD1 (10,1 cm) e em meio B5 (6,9 cm) e, também os valores verificados para o Paulsen 1103 nos três meios avaliados (ME, DSD1 e B5). No segundo grupo, o VR 043-43 apresentou resultados inferiores de comprimento de raízes nos meios (DSD1 e B5). Verificou-se que todas as médias de comprimento de raiz foram superiores às obtidas por Chée & Pool (1983) para Cabernet Sauvignon. Já Borghezán *et al.* (2003) obtiveram médias semelhantes quando estudaram o Paulsen 1103 em meio DSD1. Entretanto, Gregori & Tizio (1997) observaram valores superiores de comprimento de raiz, aos deste trabalho, com Cabernet Sauvignon em meio de Galzy (1964).

Quanto ao número de raízes primárias, a Cabernet Sauvignon apresentou as maiores médias tanto em meio B5 (4,4 raízes/broto) quanto em meio ME (4,2 raízes/broto), não diferindo estatisticamente dos porta-enxertos Paulsen 1103 no meio ME e do VR 043-43 no meio DSD1. Para o número de raízes estes valores são superiores aos obtidos por Chée & Pool (1983), Roubelakis-Angelakis & Zivanovic (1991), Zlenko *et al.* (1995), Gregori & Tizio (1997), Moreira (2000), Burkhardt (2001) e Borghezán *et al.* (2003) para diferentes variedades de *Vitis*. Entretanto para Paulsen 1103 e VR 043-43 nos meios DSD1 e B5, o número médio de raízes foi semelhante à Rupestris du Lot, Chardonnay e Pinot Noir avaliadas por Galzy *et al.* (1990).

A maior média obtida para número de folhas foi do Paulsen 1103 em meio ME (10,0 folhas/broto), mas que não diferiu estatisticamente de Paulsen nos meios DSD1 e B5, e Cabernet Sauvignon no meio DSD1. As variedades Paulsen 1103 nos três meios avaliados e Cabernet Sauvignon nos meios DSD1 e B5

apresentaram número de folhas superiores às obtidas por Torregrosa & Bouquet (1995) para o porta-enxerto Fercal em meio MS/2. Estes resultados foram superiores aos observados por Moreira (2000), Burkhardt (2001) e Borghezani *et al.* (2003) para o Paulsen 1103 e também aos de Chée & Pool (1983) para Cabernet Sauvignon.

Quando avaliada a quantidade de massa seca total da planta e dos órgãos (folhas, caule e raízes) *in vitro*, verificou-se um maior acúmulo no Paulsen 1103 no meio ME (**Tabela 2**). Esta combinação “Paulsen 1103 x meio ME” foi superior estatisticamente aos demais resultados de genótipos e meios. Este valor de massa seca total observada foi similar aos de Gregori & Tizio (1997) para a Cabernet Sauvignon e aos de Galzy (1990) para a Chardonnay. No entanto, estes mesmos autores observaram valores superiores para as variedades Rupestris du Lot e Pinot Noir. Outros autores, tais como: Galzy *et al.* (1990), Lima da Silva (1995), Torregrosa & Bouquet (1995) e Fila *et al.* (1998) também observaram valores superiores de produção de biomassa *in vitro* para diferentes variedades de videira.

**Tabela 2.** Quantidade de massa seca das folhas, raízes e caule das variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon após 60 dias *in vitro*, nos meios de cultura ME<sup>(1)</sup>, DSD1<sup>(2)</sup> e B5<sup>(3)</sup>.

Variedades	Meios de cultura	Massa seca (mg)			
		Folhas	Raízes	Caule	Total
Paulsen 1103	ME	13,6 ± 6,3 <b>a</b>	15,4 ± 10,3 <b>a</b>	9,6 ± 4,9 <b>a</b>	38,6 ± 21,5 <b>a</b>
	DSD1	5,6 ± 2,3 <b>bc</b>	2,6 ± 1,9 <b>b</b>	2,8 ± 0,4 <b>bc</b>	11,0 ± 4,6 <b>bcd</b>
	B5	7,4 ± 5,9 <b>b</b>	4,8 ± 3,5 <b>b</b>	4,8 ± 3,1 <b>b</b>	17,0 ± 12,5 <b>b</b>
VR 043-43	DSD1	3,0 ± 1,6 <b>bc</b>	1,4 ± 0,5 <b>b</b>	1,8 ± 0,4 <b>bc</b>	6,2 ± 2,5 <b>cd</b>
	B5	1,0 <b>c</b>	1,0 <b>b</b>	1,2 ± 0,4 <b>c</b>	3,2 ± 0,4 <b>d</b>
Cabernet Sauvignon	ME	2,6 ± 1,1 <b>bc</b>	3,4 ± 1,1 <b>b</b>	2,8 ± 2,2 <b>bc</b>	8,8 ± 4,4 <b>bcd</b>
	DSD1	7,4 ± 1,8 <b>b</b>	4,2 ± 0,4 <b>b</b>	4,4 ± 1,1 <b>bc</b>	16 ± 3,3 <b>b</b>
	B5	6,8 ± 2,2 <b>b</b>	3,2 ± 1,6 <b>b</b>	3,2 ± 1,6 <b>bc</b>	13,2 ± 5,4 <b>bc</b>

Os valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade; os valores das variáveis são apresentados como média ± desvio padrão.

<sup>(1)</sup>Torregrosa, 1998; <sup>(2)</sup>Lima da Silva & Doazan, 1995; <sup>(3)</sup>Gamberg *et al.*, 1968.

Quando analisada a quantidade de massa seca das folhas, observa-se um valor estatisticamente superior para o Paulsen 1103 no meio ME (13,6 mg) e uma média estatisticamente inferior para o VR 043-43 no meio B5 (1,0 mg). As demais combinações entre variedades e meios apresentaram valores intermediários de

7,4 a 2,6 mg e não significativos entre si. Gregori & Tizio (1997) analisando Cabernet Sauvignon e, Moreira (2000) e Borghezan *et al.* (2003) para diferentes variedades de videira obtiveram médias superiores para massa seca de folhas.

Dois grupos foram formados na análise de massa seca das raízes, um contendo Paulsen 1103 em meio ME com valor estatisticamente superior. O outro contendo as demais combinações variedades e meios de cultura. Para esta variável a média apresentada pelo Paulsen 1103 no meio ME foi superior às obtidas por Gregori & Tizio (1997) em Cabernet Sauvignon e Moreira (2000), Burkhardt (2001) e Borghezan *et al.* (2003) para Paulsen 1103.

Quanto a massa seca de caule, verificou-se que novamente o Paulsen 1103 em ME apresentou média superior as demais. Para as três variedades os valores observados foram superiores aos de Burkhardt (2001), mas inferiores aos de Gregori & Tizio (1997), Moreira (2000) e Borghezan *et al.* (2003).

Observou-se que no meio ME, as variedades de videira tiveram maior acúmulo de massa seca nas raízes, e nos meios DSD1 e B5, nas folhas. O maior acúmulo de massa seca nas folhas em meio de cultura DSD1 também foi verificado por Gregori & Tizio (1997) para Cabernet Sauvignon, Moreira (2000), Burkhardt (2001) e Borghezan *et al.* (2003) para diferentes porta-enxertos de videira.

O porta-enxerto VR 043-43 apresentou valores inferiores ao Paulsen 1103 e a Cabernet Sauvignon em todos os parâmetros avaliados. Para Torregrosa & Bouquet (1995) híbridos de *V. vinifera* X *M. rotundifolia* (VR) apresentam uma grande variabilidade no crescimento, mesmo entre os clones. Deste modo, esta variedade pode-se inferir que esta variedade não respondeu aos estímulos do meio de cultura, assim como observado em trabalhos de Moreira (2000) e Borghezan *et al.* (2003).

Para a variedade Paulsen 1103, o meio de cultura ME proporcionou os melhores resultados, pois demonstrou maior capacidade de crescimento de parte aérea e principalmente acúmulo de massa seca. Paulsen 1103 pode ser considerada uma variedade que apresenta melhores resultados em meios de cultura enriquecidos. Já para a VR 043-43 e a Cabernet Sauvignon, o meio DSD1 foi superior. Mesmo assim, os resultados obtidos para Cabernet Sauvignon sugerem que esta seja uma variedade que não necessita de meios de cultura enriquecidos.

Em conclusão, a propagação *in vitro* através de gemas é uma metodologia eficiente para a multiplicação clonal das variedades de videira: Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon. No entanto, esta metodologia ainda requer aperfeiçoamento, principalmente em relação à variedade VR 043-43 que demonstrou baixo crescimento *in vitro*.

A metodologia de multiplicação de gemas axilares, sem o uso de reguladores de crescimento, é uma ferramenta apropriada para seleção, multiplicação e conservação de germoplasma *in vitro*.

## 5.2. Calogênese e Organogênese

Independente dos meios de cultura e reguladores de crescimento utilizados, a variedade Paulsen 1103 apresentou a maior porcentagem de calos (84,2%), seguido de VR 043-43 (71,7%) e Cabernet Sauvignon (65%).

Conforme a **Tabela 3**, o meio de cultura B5 acrescido da citocinina TDZ (thidiazuron) nas concentrações testadas de 5; 10 e 20  $\mu\text{mol}$  apresentaram as maiores porcentagens de calos produzidos. O TDZ é um composto sintético que tem sido muito utilizado para a indução da embriogênese somática e morfogênese em diversas espécies de plantas (MURTHY *et al.* 1998). Este composto tem sido aplicado com sucesso na substituição de BAP em diversas variedades de *Vitis*, embora o efeito seja altamente dependente da fonte de explante e do genótipo usado no experimento (Oláh *et al.*, 2003).

O meio de cultura B5 com TDZ 5  $\mu\text{mol}$  apresentou alta eficiência na indução com 100% de calos formados. No entanto, só apresentou diferenças estatísticas dos tratamentos do meio ME com a presença de BAP nas concentrações testadas (5, 10, 20  $\mu\text{mol}$ ). A alta eficiência para a indução e produção de calos no meio B5 também foi relatada por Moriguchi *et al.* (1988) para as variedades Kyoho (*V. vinifera* x *V. labrusca*) e Koshusanjaku (*V. vinifera*).

**Tabela 3.** Médias de calos formados entre as variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon nos meios de cultura ME<sup>(1)</sup> e B5<sup>(2)</sup>, acrescidos de BAP/ANA<sup>(3)</sup> ou TDZ/ANA<sup>(3)</sup>, após 30 dias de cultura *in vitro*.

Meio de cultura	Concentração de citocinina (µmol)	Calos formados (%)
ME	BAP 5	40,0 ± 17,3 <b>cd</b>
	BAP 10	53,3 ± 47,3 <b>bcd</b>
	BAP 20	30,0 ± 17,3 <b>d</b>
	TDZ 5	90,0 ± 10,0 <b>ab</b>
	TDZ 10	80,0 ± 17,3 <b>ab</b>
	TDZ 20	63,3 ± 35,1 <b>abcd</b>
B5	BAP 5	83,3 ± 15,3 <b>ab</b>
	BAP 10	83,3 ± 5,8 <b>ab</b>
	BAP 20	73,3 ± 15,3 <b>abc</b>
	TDZ 5	100,0 <b>a</b>
	TDZ 10	93,3 ± 11,5 <b>ab</b>
	TDZ 20	93,3 ± 11,5 <b>ab</b>

Os valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade; os valores das variáveis são apresentados como média ± desvio padrão.

<sup>(1)</sup>Torregrosa, 1998; <sup>(2)</sup>Gamborg *et al.*, 1968.

<sup>(3)</sup>Concentrações 5/0,2; 10/0,2 ou 20/0,2 µmol.

As porcentagens de calos formados em cada variedade nos seis tratamentos estão apresentadas na **Figura 2**.

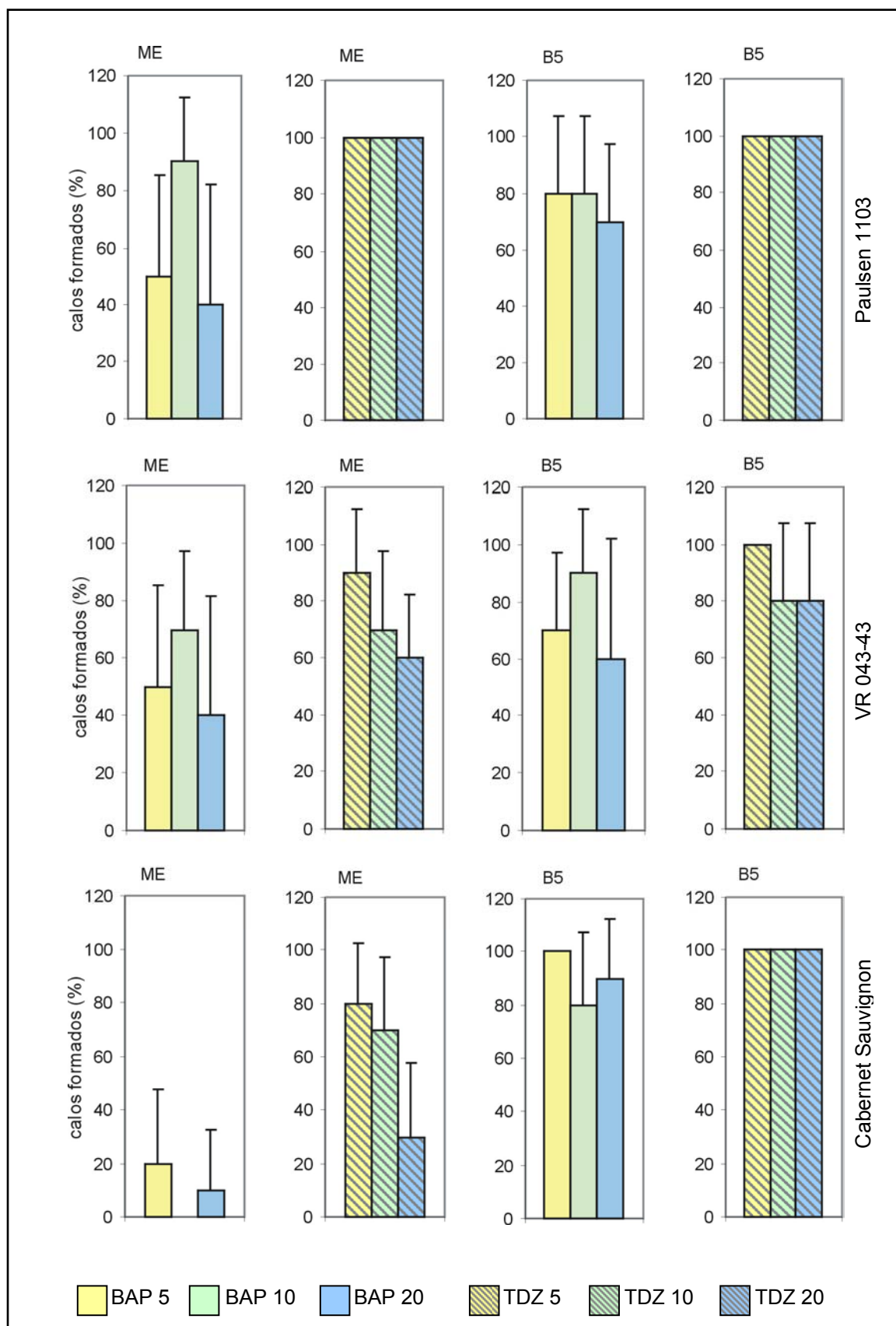
O porta-enxerto Paulsen 1103 nos meios de cultura acrescidos da citocinina TDZ produziram maior quantidade de calos. Observou-se que tanto o meio ME quanto o meio B5 nas concentrações de TDZ (5, 10 e 20 µmol) proporcionaram maior número de calos por explantes formados, com o total de 100%. Para o VR 043-43, as maiores médias foram obtidas em meio B5 com TDZ 5 µmol (100%). Na variedade Cabernet Sauvignon a produção de calos foi superior (100%) nas combinações do meio B5 com BAP (5 µmol) e TDZ (5, 10, 20 µmol).

A eficiência da citocinina TDZ na produção de calos foi citada por Wilhelm (1999) e altas concentrações desta citocinina proporcionaram a produção de calos mais volumosos. Para Huetteman & Preece (1993) o TDZ é um excelente estimulante para formação de calos em concentrações iguais ou maiores que 1,0 mM.



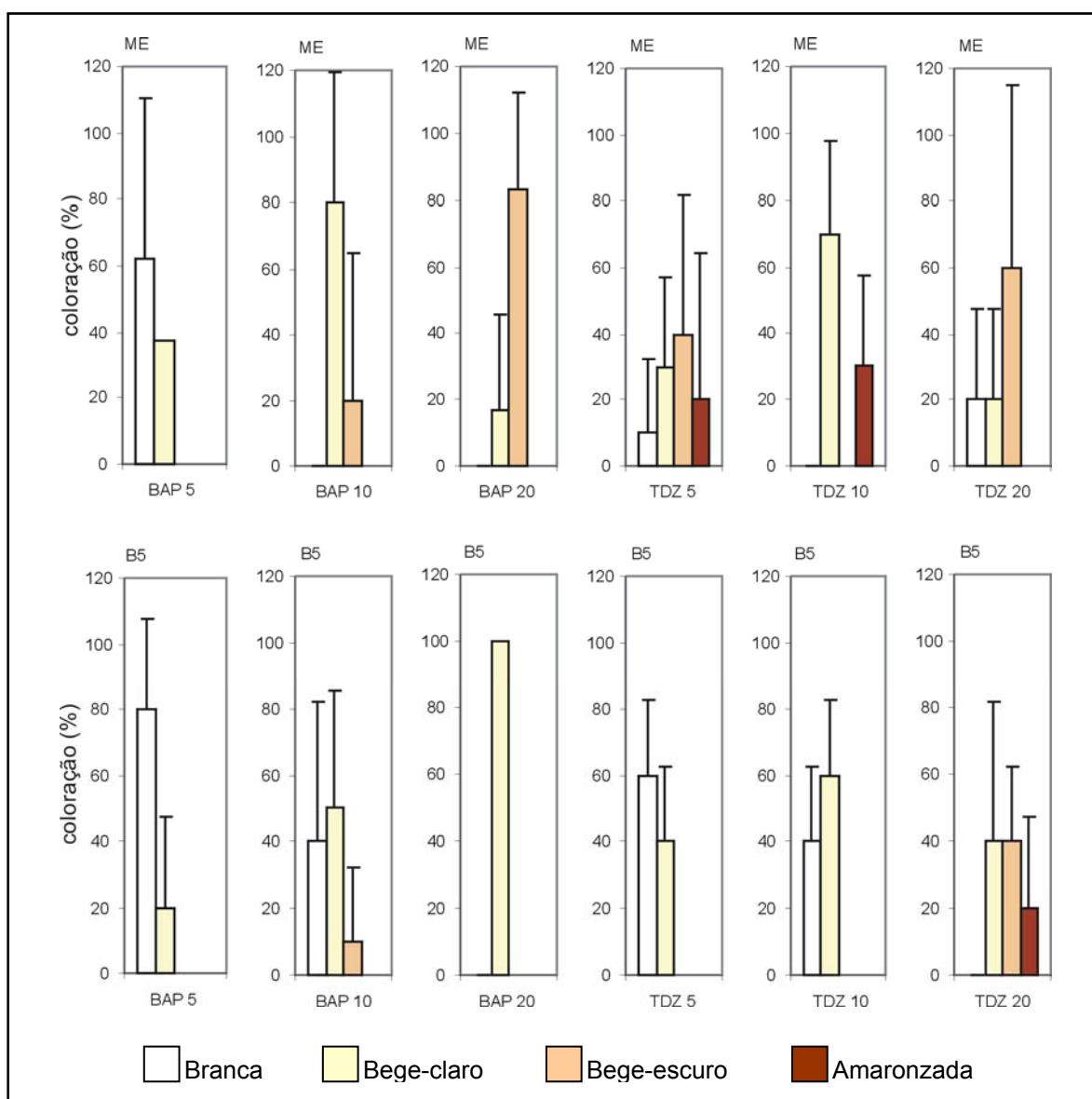
Martinelli *et al.* (1996) avaliando a organogênese em 18 variedades de videira em meio MS acrescido de 10 µmol de BAP e 0,2 µmol de ANA observaram a formação direta de brotos em 15 variedades e produção de calos em três.

Rajasekaran & Mullins (1981) relatam 80% de calos produzidos em meio de cultura NN (Nitsch & Nitsch, 1969) acrescido de 10 µmol de NOA (ácido naftóxiacético) para híbridos de videira.



**Figura 2.** Porcentagem de calos formados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), acrescidos de BAP ou TDZ (5, 10, 20  $\mu$ mol) e ANA (0,2  $\mu$ mol). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias.

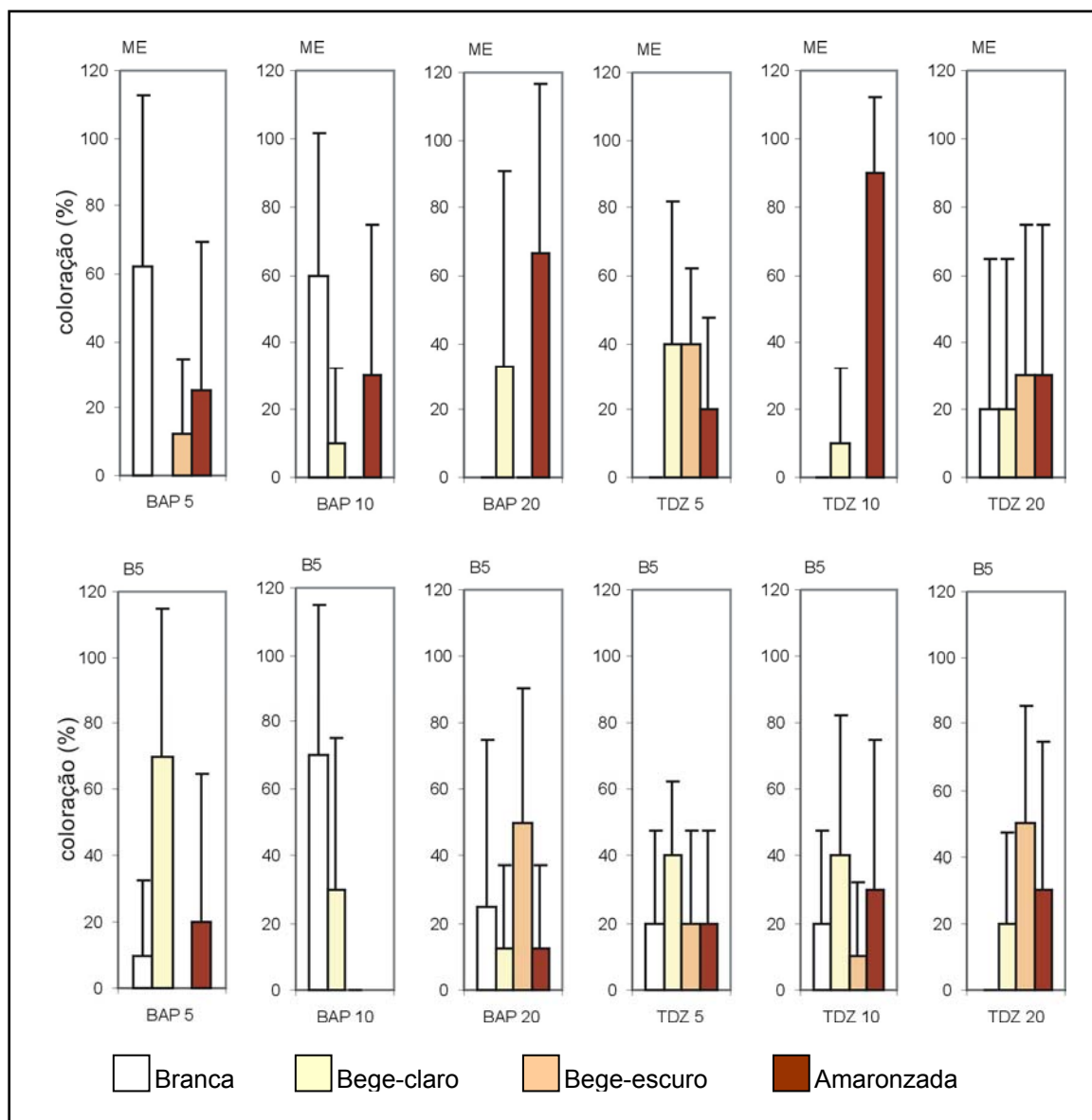
Os dados sobre as colorações da variedade Paulsen 1103 encontram-se na **Figura 3**. Calos de cor branca foram observados nos tratamentos com os meios B5 com 5  $\mu\text{mol}$  de BAP e TDZ, além do meio ME acrescido de 5  $\mu\text{mol}$  de BAP. A presença de calos bege-claros foi observada em todos os tratamentos, com destaque para os tratamentos do meio B5 com 20  $\mu\text{mol}$  de BAP e meio ME com 10  $\mu\text{mol}$  de BAP. As colorações consideradas escuras, bege-escuro e amarronzada, foram obtidas principalmente no meio de cultura ME com altas concentrações de citocinina (20  $\mu\text{mol}$  de BAP e TDZ).



**Figura 3.** Coloração dos calos da variedade Paulsen 1103 formados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), acrescidos de BAP ou TDZ (5, 10, 20  $\mu\text{mol}$ ) e ANA (0,2  $\mu\text{mol}$ ). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias.

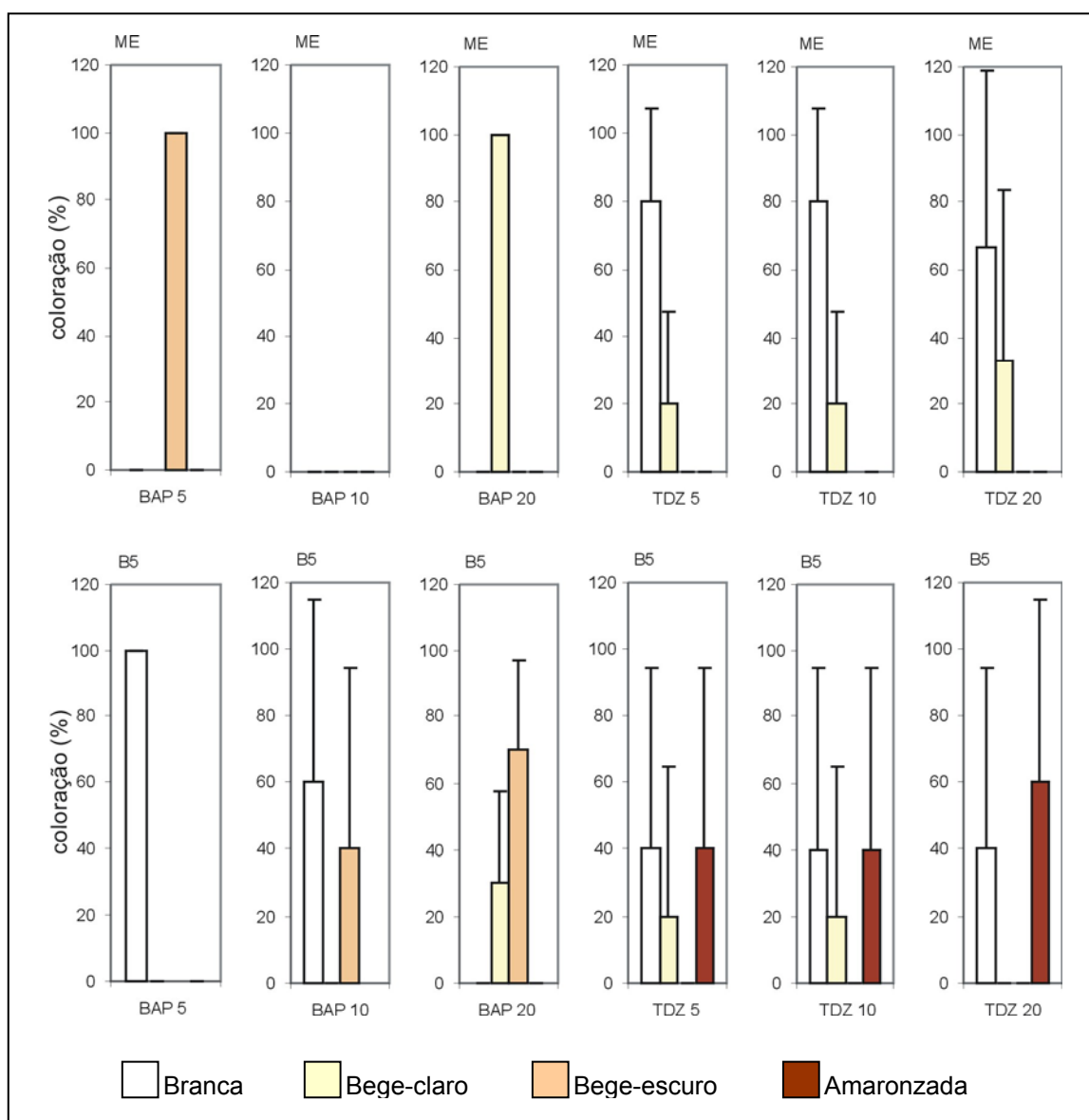
Para o porta-enxerto VR 043-43 observaram-se calos de cor branca em baixas e médias concentrações de BAP (5 e 10  $\mu\text{mol}$ ) em ambos os meios de cultura. Calos bege-escuros e amarronzados foram observados, principalmente, em meio ME com altas concentrações de citocinina.

Observou-se para esta variedade que as baixas concentrações de BAP proporcionaram calos de colorações branca e bege-clara, enquanto que concentrações médias e altas de TDZ induziram calos mais escuros (**Figura 4**).



**Figura 4.** Coloração dos calos da variedade VR 043-43 formados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), acrescidos de BAP ou TDZ (5, 10, 20  $\mu\text{mol}$ ) e ANA (0,2  $\mu\text{mol}$ ). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias.

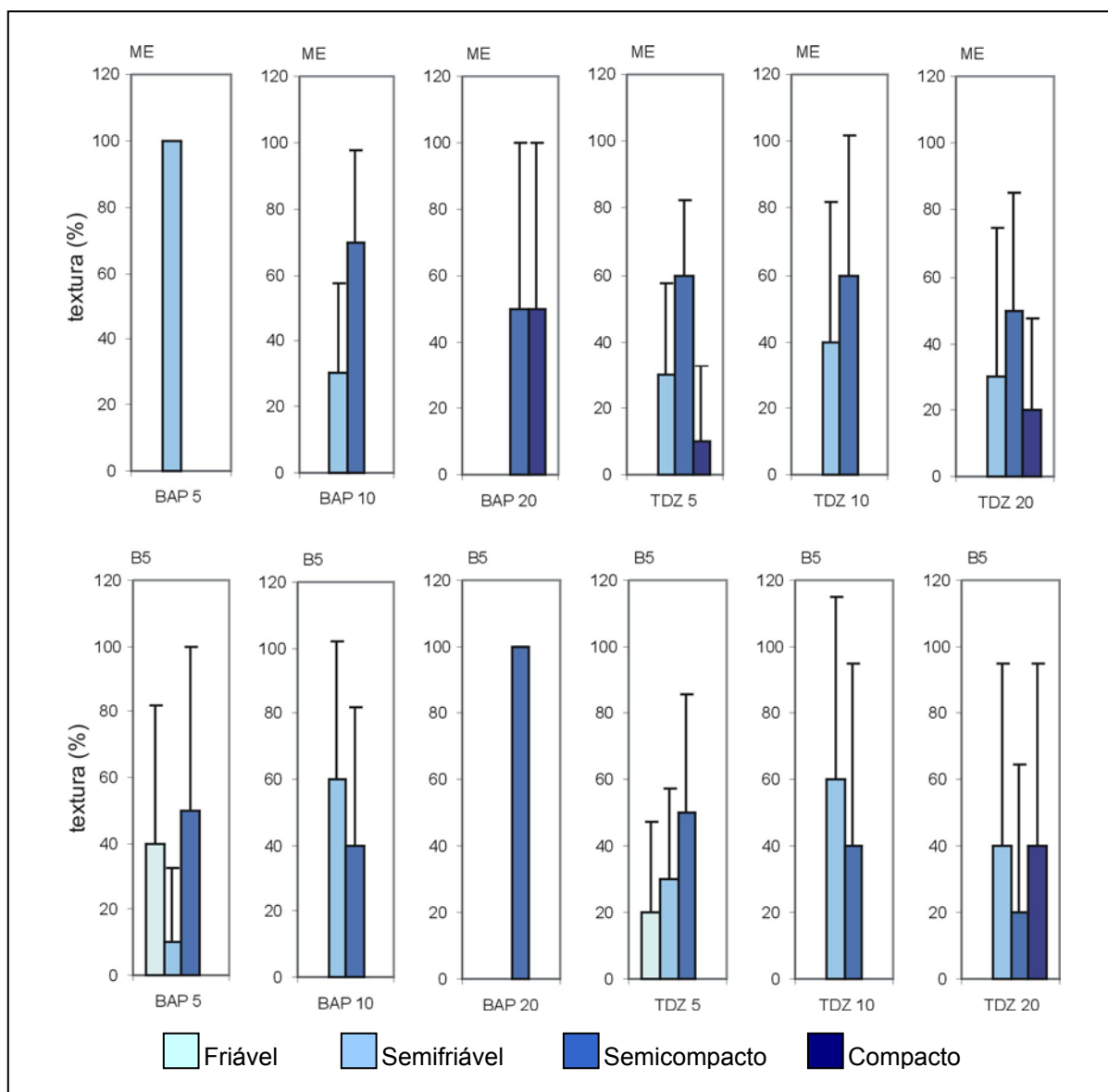
Na variedade Cabernet Sauvignon, observou-se que o meio ME com TDZ (5, 10, 20  $\mu\text{mol}$ ) e o meio B5 com concentrações 5 e 10  $\mu\text{mol}$  de BAP induziram a maior porcentagem de calos brancos. O meio ME com 5  $\mu\text{mol}$  de BAP produziu 100% de calos bege-escuros e com 20  $\mu\text{mol}$  de BAP produziu 100% de calos bege-claros. Calos amarronzados foram obtidos apenas no meio de cultura B5 com TDZ (**Figura 5**). Observou-se que a citocinina TDZ em meio ME estimulou a maior formação de calos brancos. No entanto, em meio B5 proporcionou a formação de calos amarronzados (oxidados).



**Figura 5.** Coloração dos calos da variedade Cabernet Sauvignon formados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), acrescidos de BAP ou TDZ (5, 10, 20  $\mu\text{mol}$ ) e ANA (0,2  $\mu\text{mol}$ ). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias.

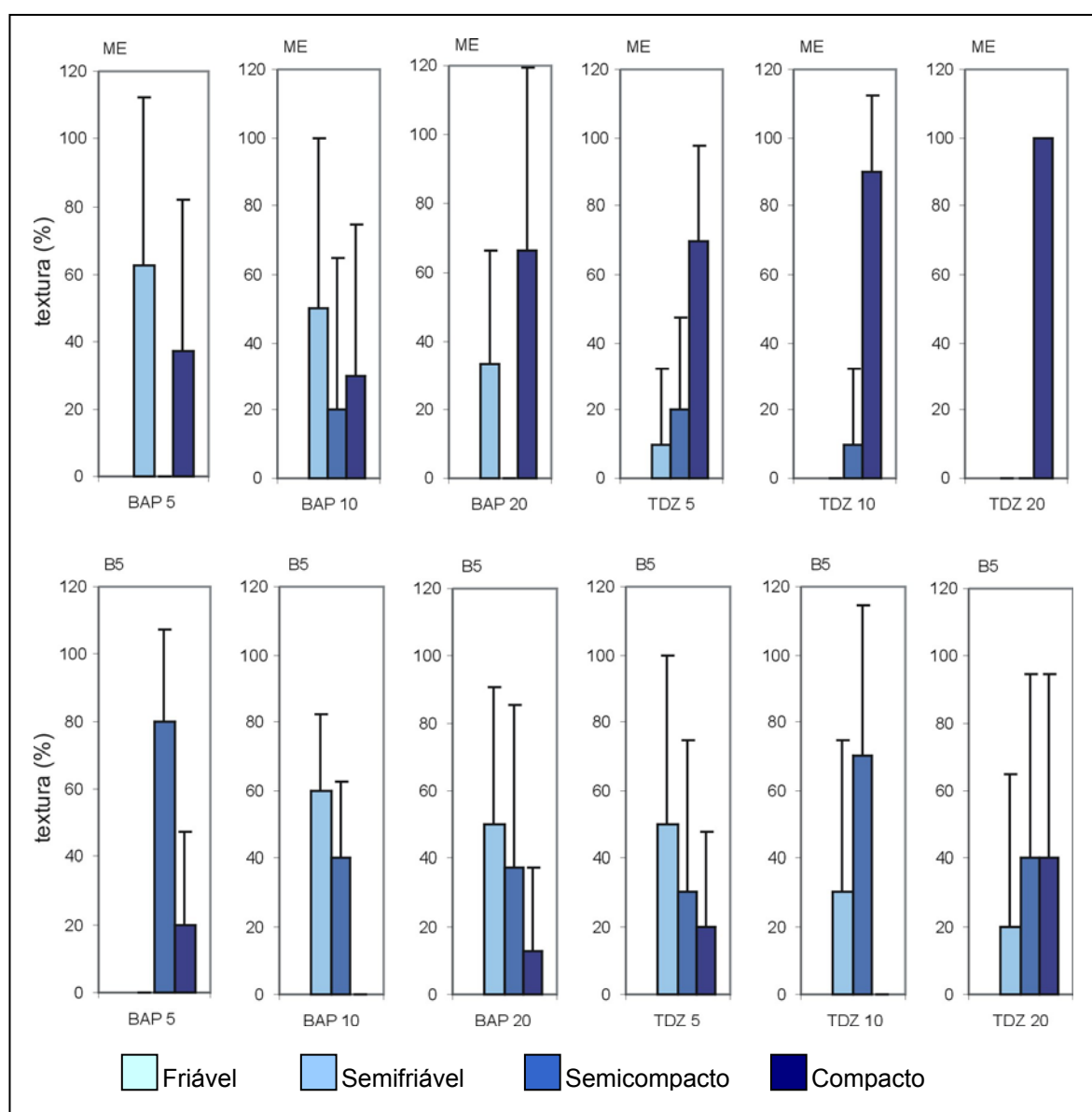
Os calos foram avaliados quanto a textura e classificados em friáveis, semifriáveis, semicompactos e compactos.

A variedade Paulsen 1103 apresentou nos meios de cultura ME e B5 altas porcentagens de calos semicompactos, especialmente no meio B5 com BAP 20  $\mu\text{mol}$  que produziu 100% dos calos com esta textura. No meio ME a citocinina BAP com 5  $\mu\text{mol}$  formou calos semifriáveis (100%). Para o meio B5 a formação de calos semifriáveis foi superior com as concentrações de 10  $\mu\text{mol}$  de BAP e TDZ (**Figura 6**).



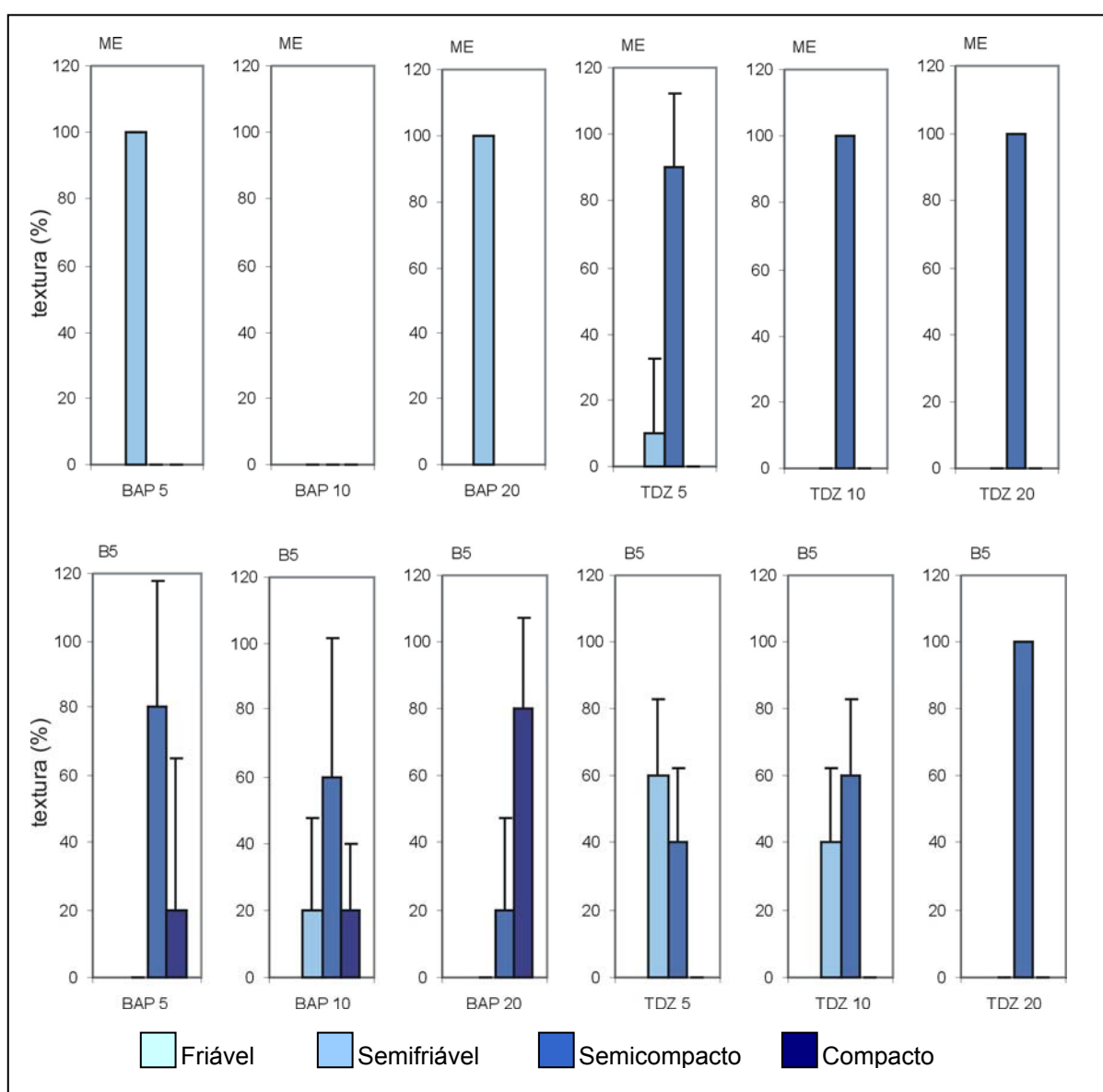
**Figura 6.** Textura dos calos da variedade Paulsen 1103 formados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), acrescidos de BAP ou TDZ (5, 10, 20  $\mu\text{mol}$ ) e ANA (0,2  $\mu\text{mol}$ ). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias.

A variedade VR 043-43 apresentou altas porcentagens de calos compactos no meio de cultura ME, especialmente com alta concentração de BAP (20  $\mu\text{mol}$ ) e em todas as concentrações de TDZ testadas. No entanto, verificou-se que em concentrações de 5 e 10  $\mu\text{mol}$  de BAP os calos observados eram semifriáveis. No meio de cultura B5 observaram-se calos semifriáveis para as concentrações de 10 e 20  $\mu\text{mol}$  de BAP e 5  $\mu\text{mol}$  de TDZ. Na concentração baixa de BAP (5  $\mu\text{mol}$ ) e média de TDZ (10  $\mu\text{mol}$ ) a maioria dos calos formados foram semicompactos e compactos (**Figura 7**).



**Figura 7.** Textura dos calos da variedade VR 043-43 formados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), acrescidos de BAP ou TDZ (5, 10, 20  $\mu\text{mol}$ ) e ANA (0,2  $\mu\text{mol}$ ). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias.

A textura friável não foi observada em calos da Cabernet Sauvignon. No entanto, o meio de cultura ME com as concentrações de 5 e 20  $\mu\text{mol}$  BAP apresentaram 100% de calos semifriáveis. Independente do meio de cultura, altas concentrações de TDZ induziram a formação de calos semicompactos (100%), observações similares para o meio ME com 5 e 10  $\mu\text{mol}$  de TDZ e o meio B5 com 5  $\mu\text{mol}$  de BAP. Para o meio B5, apenas a concentração de 5  $\mu\text{mol}$  de TDZ formou maior porcentagem de calos semifriáveis (**Figura 8**).



**Figura 8.** Textura dos calos da variedade Cabernet Sauvignon formados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), acrescidos de BAP ou TDZ (5, 10, 20  $\mu\text{mol}$ ) e ANA (0,2  $\mu\text{mol}$ ). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias.



O meio de cultura ME com 5  $\mu$ mol de BAP, apesar de produzir baixa porcentagem de calos (40%) proporcionou calos mais claros e semifriáveis para as três variedades.

Verificou-se que para a variedade Paulsen 1103, o meio de cultura ME com 5  $\mu$ mol BAP e o meio B5 com 5 e 10  $\mu$ mol BAP e TDZ produziram a maioria dos calos com coloração branca e bege-clara e semifriáveis. Resultados semelhantes foram observados para VR 043-43. Já Cabernet Sauvignon apresentou a maioria dos calos com textura semicompacta, apesar das colorações branca e bege-clara serem mais abundantes. Foram observados calos semifriáveis somente no meio ME com 5 e 10  $\mu$ mol de BAP.

Os calos de textura friável foram observados apenas em Paulsen 1103 no meio B5 com 5  $\mu$ mol de BAP, mas com porcentagem similar a dos calos semicompactos.

Verificou-se que tanto a coloração quanto a textura foram fortemente influenciadas pelo tipo de reguladores de crescimento. Baixa concentração de BAP (5  $\mu$ mol) proporcionou calos friáveis para as variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon. Entretanto, a mesma concentração de TDZ apresentou calos na maioria semicompactos. Estes dados corroboram com Rjasekaram & Mullins (1981), onde observaram calos friáveis e semifriáveis em baixa concentração de BAP e baixas concentrações de ANA e NOA. Mas, em baixa e alta concentração de 2,4-D, os calos apresentaram textura compacta. Esta grande variabilidade observada referente à indução e produção e diferentes colorações e texturas dos calos foi citada por Warrag *et al.* (1991) e Hervé *et al.* (2001), como sendo resultado, principalmente da influência a concentração de reguladores de crescimento.

Durante o período de avaliação não foi observada a emissão de folhas, brotos ou raízes. Mas após os 30 dias verificou-se rizogênese para as variedades Paulsen 1103 no meio ME com BAP (0,28 raízes/calos), no meio B5 com BAP (1,65 raízes/calos) e TDZ (0,03 raízes/calos); VR 043-43 no meio ME com BAP (0,12 raízes/calos) e no meio B5 com BAP (1,68 raízes/calos); Cabernet Sauvignon no meio B5 com BAP (0,22 raízes/calos).

### 5.3. Indução da embriogênese somática

Neste trabalho, foi realizada a indução de calos em dois meios de cultura: ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), cada um acrescido de 5 µmol de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) e 1 µmol de BAP (6-benzilaminopurina). Dentre as auxinas, o 2,4-D tem sido reportado como o regulador de crescimento sintético mais adequado à indução e manutenção de calos para as mais diversas espécies vegetais em cultura *in vitro* (Gamborg *et al.*, 1976). Para Chée & Cantliffe, (1988) e Guerra *et al.* (1998) as citocininas podem favorecer a produção de calos embriogênicos. No entanto, Schenk & Hildebrandt, 1972 afirmaram que baixas concentrações das mesmas são necessárias para a embriogênese somática na maioria das culturas de células de dicotiledôneas.

Os calos foram avaliados aos 35 dias de cultura *in vitro*, de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.4. Verificou-se a formação e a classe em que estes poderiam ser enquadrados, assim como a textura e coloração dos mesmos. Este período foi semelhante ao de Robacker (1993) que obteve a produção de calos de diversas variedades de *Vitis* do grupo Muscadinia em meio NN (Nitsch & Nitsch, 1969) acrescido de 2,4-D.

O total de calos produzidos por tratamento é apresentado na **Tabela 5**. Dentre as variedades, a Paulsen 1103 obteve a maior média de calos formados (77,8%), seguida da VR 043-43 (72,2%) e da Cabernet Sauvignon (63,2%), independente do meio de cultura e fonte de explante.

Quando analisados os meios de cultura, observou-se que o meio B5 proporcionou maior porcentagem de calos formados (80,1%) do que ME (62,1%).

Entre as fontes de explantes, o pecíolo foi considerado mais eficiente na indução e produção de calos quando comparado aos discos foliares. Tanto para o meio ME quanto para o meio B5 os resultados de pecíolo foram superiores com 79,6% e 92,6% de calos formados, respectivamente. Muitos trabalhos têm mostrado que vários explantes, tais como: anteras, ovários, discos foliares e pecíolos são boas fontes de explante para a indução de calos e culturas celulares (Krul & Worley, 1977; Bouquet *et al.*, 1982; Rajasekaran & Mullins, 1983; Martinelli *et al.*, 1991; Matsuda, 1992). O uso de pecíolo como fonte de explante foi relatada por Martinelli *et al.* (1993), com resultado de 100% na formação de calos em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), para quatro variedades de *V. rupestris*.

Torregrosa *et al.* (1995) informaram uma produção não significativa de calos a partir de explantes foliares de híbridos *Vitis X Muscadinia* em meio contendo 2,4-D.

**Tabela 4.** Porcentagem de calos formados *in vitro*, após 35 dias, das variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968) com discos foliares (F) e pecíolos (P) como fontes de explantes.

Variedades	% de calos formados				Média
	Meios de cultura				
	ME		B5		
	Explantes				
	F	P	F	P	
Paulsen 1103	41,7	72,2	97,2	100	77,8
VR 043-43	50	100	61,1	77,8	72,2
Cabernet	41,7	66,7	44,4	100	63,2
Sauvignon					
Média	44,5	79,6	67,6	92,6	
	62,1		80,1		

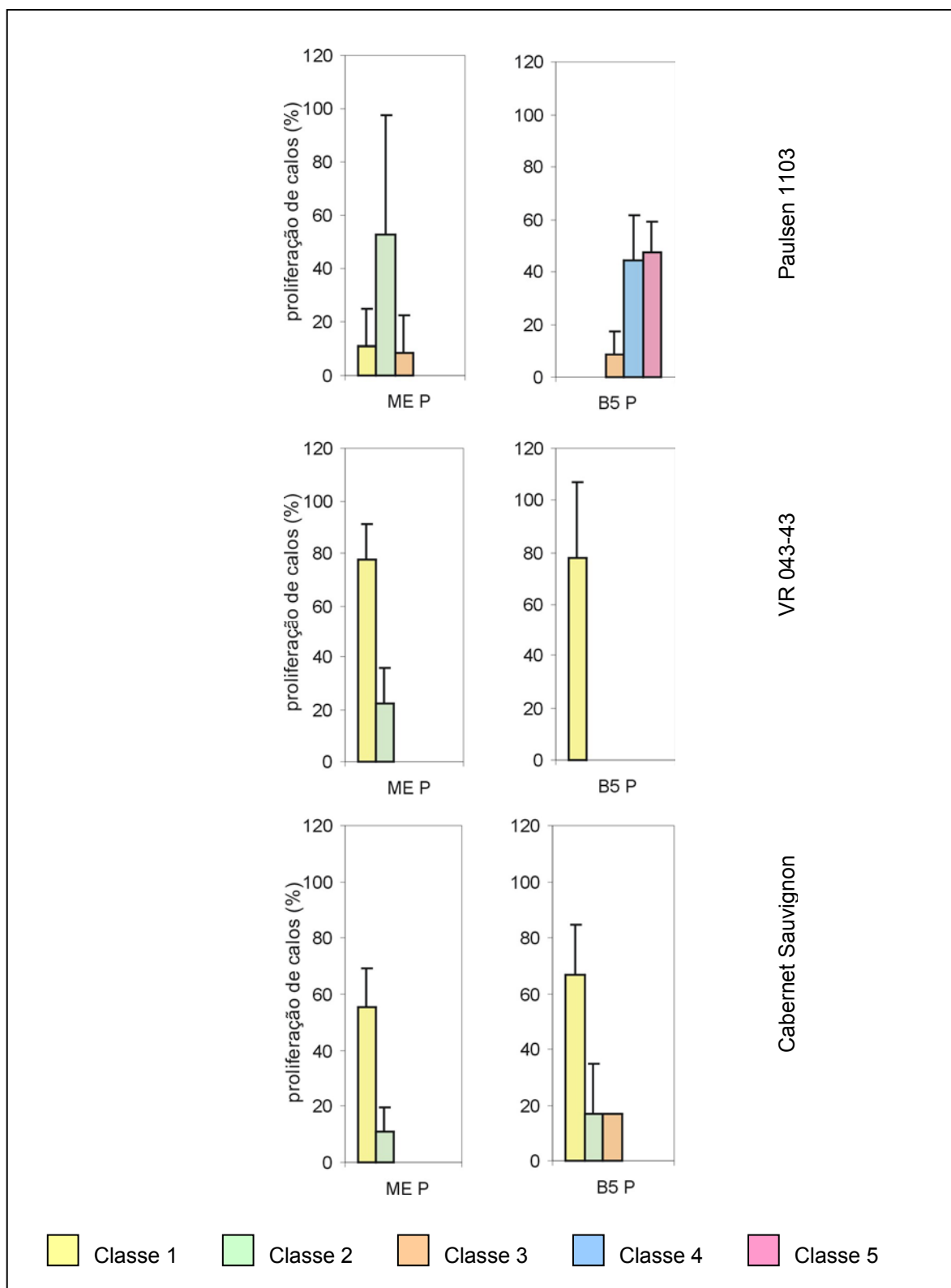
A partir destes dados foram realizadas as análises de proliferação celular (tamanho do calo), coloração e textura dos calos induzidos a partir de pecíolo.

Com relação à área (intensidade de proliferação, tamanho) dos calos, o porta-enxerto Paulsen 1103, no meio de cultura B5, apresentou calos grandes de classes 4 (44,4%) e 5 (47,2%). Já no meio de cultura ME, a intensidade de proliferação foi menor, induzindo calos menores, principalmente, de classe 2 (52,8%) (**Figura 9**). Estes resultados corroboram com os trabalhos de Torregrosa (1998) de embriogênese somática com *Vitis vinifera* em meio de cultura ME, que obteve médias semelhantes para a indução de calos, independente das classes.

As variedades VR 043-43 e Cabernet Sauvignon apresentaram calos com tamanhos menores, sendo que a grande maioria destes calos concentraram-se na classe 1. O porta-enxerto VR 043-43 no meio ME apresentou calos de classe 1 (77,8%) e 2 (22,2%), e no meio B5, apenas calos de classe 1 (77,8%). A Cabernet Sauvignon, além de calos de classe 1 (66,7%), também produziu calos nas classes 2 (16,7%) e 3 (16,7%) em meio B5, e calos de classe 1 (55,5%) e 2 (11,1%) em meio de cultura ME (**Figura 9**).

Para Devlin (1975), a adição de auxina ao meio de cultura, além de induzir a formação de calos, torna-se necessária pela continuidade do crescimento do mesmo. A proliferação celular (quantidade de calo) formada está relacionada com a concentração de auxina aplicada. Altas concentrações causam aumento de crescimento nos tecidos calosos. Hartman e Kester (1983), relataram que concentrações moderadamente altas de auxinas, acima de  $1.0 \text{ mg.l}^{-1}$  são suficientes para a produção de calos.

A classificação dos calos neste trabalho corresponde à área dos mesmos. Desta maneira, observou-se que as variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon responderam de diferentes maneiras aos tratamentos. O meio de cultura B5 proporcionou maior produção de calos para Paulsen 1103, já o meio ME foi melhor para VR 043-43 e Cabernet Sauvignon.



**Figura 9.** Proliferação de calos induzidos a partir de pecíolos inoculados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1962) avaliada em três variedades de videira: Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon. Meios de cultura acrescidos de 2,4-D (5  $\mu$ mol) e BAP (1  $\mu$ mol). Barras verticais representam os desvios padrões das médias.

As colorações dos calos também foram observadas. Para efeito de classificação, foram determinadas quatro colorações (branca, bege-clara, bege-escura e amarronzada), de acordo com o item 4.3.4. Amostras das colorações podem ser visualizadas na **Figura 10**.

O Paulsen 1103 no meio de cultura ME produziu maior quantidade de calos de coloração bege-escura (55,6%) e amarronzada (44,4%), e no meio B5 este porta-enxerto produziu calos essencialmente bege-claros (100%). Os calos de VR 043-43 formados em meio ME apresentaram as colorações bege-escura (72,2%) e amarronzada (27,8%), mas em meio B5, os calos eram na sua maioria bege-claros (62,8%) e amarronzados (37,2%). A variedade Cabernet Sauvignon foi a única que apresentou calos de coloração branca, mas calos de coloração bege-clara foram superiores em ambos os meios de cultura (ME – 50,8% e B5 – 69,4%) (**Figura 11**).

Estudando embriogênese somática em videiras do grupo Muscadinia, Robacker (1993) relata diferentes colorações obtidas, tais como branca, branca-acinzentada, amarela, amarela-acinzentada, marrom-claro e marrom-escuro. Para este autor, os calos de coloração escura, bege-escura ou acinzentada, apresentaram maior potencialidade para formação de embriões somáticos.

Para Mozsár & Viczián (1996) calos de coloração bege-clara produziram pró-embriões em cinco variedades de *V. vinifera* em meio MS.

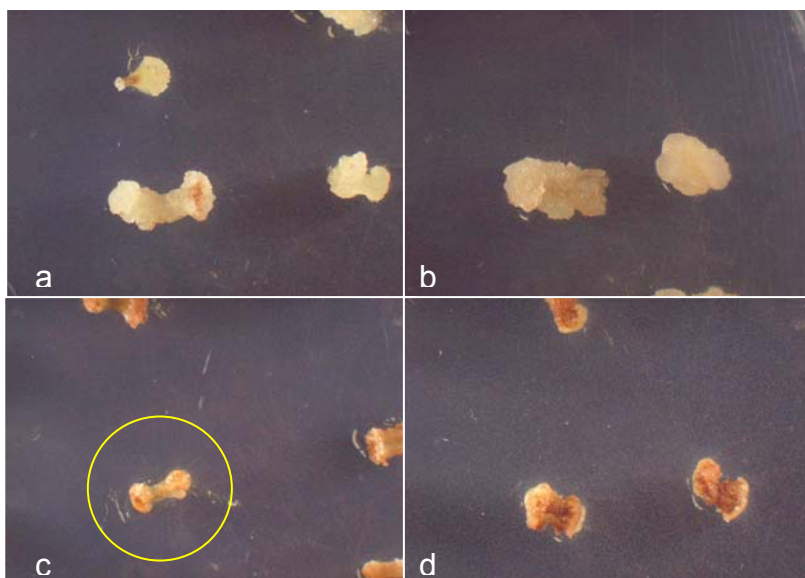
Segundo Gribaudo *et al.* (2000), colorações branca e bege-escuro foram encontradas em proporções semelhantes em calos induzidos de discos foliares em meio de cultura NN (Nitsch & Nitsch, 1969), também utilizando 2,4-D, para diversas variedades de *V. vinifera* e *V. rupestris*.

Embriões zigóticos inoculados em meio N-1 (Nitsch & Nitsch, 1969 modificado) produziram calos de coloração branca à amarelo-pálido, tornando-se amarronzados e acinzentados após quatro semanas de cultivo (Gray, 1992).

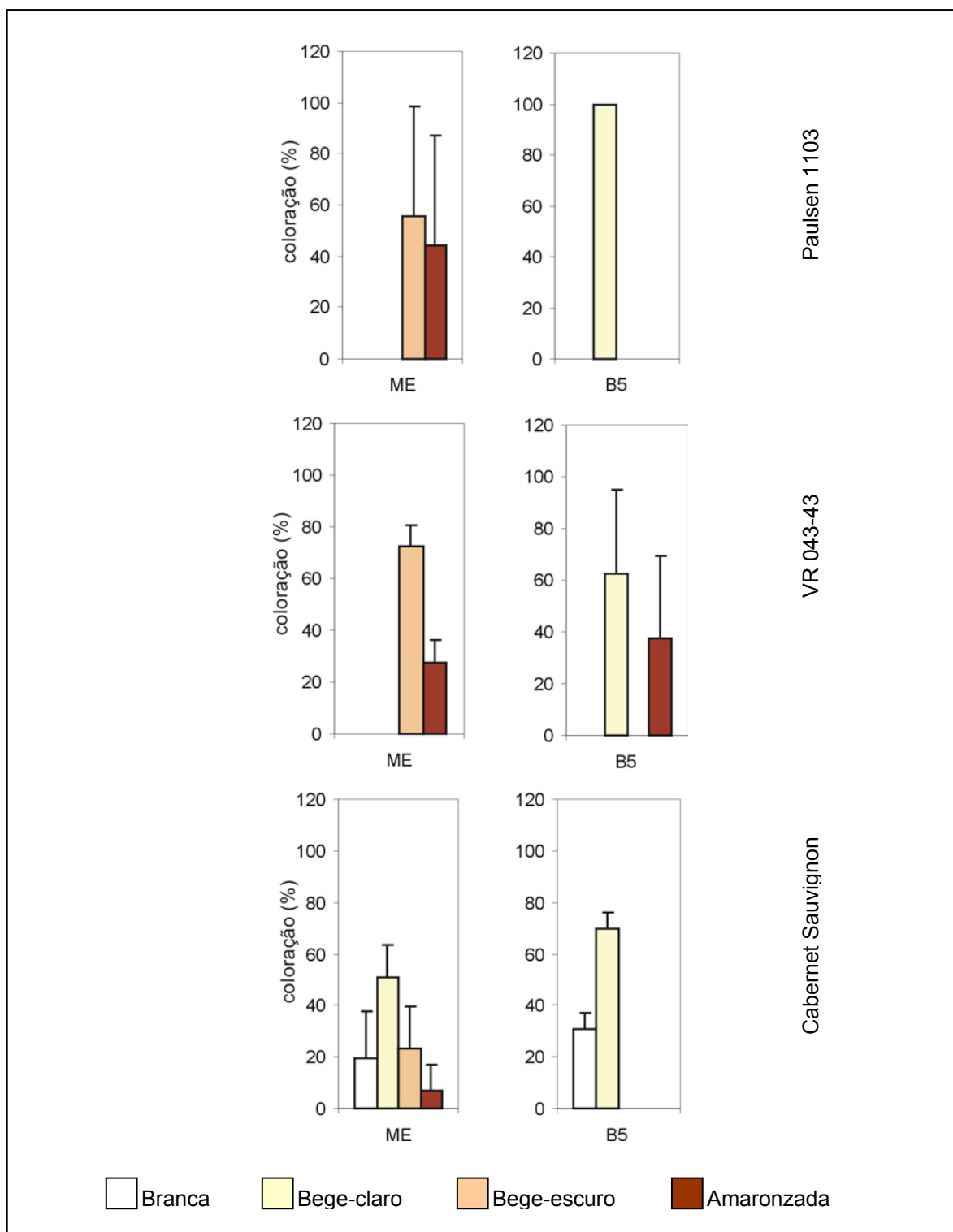
Perrin *et al.* (2001), utilizando meio de cultura com alta concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  para Cabernet Sauvignon, obtiveram calos de coloração escura e que apresentavam embriões mal formados. No entanto, ao utilizarem meio de cultura com uma menor concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , para o porta-enxerto 110R, os calos tinham coloração branca e eram altamente embriogênicos.

Verifica-se que o meio de cultura ME possui a metade da concentração de sais de MS. Assim, possivelmente, os calos de colorações escuras observadas neste trabalho podem não estar diretamente relacionados à concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  no meio.

De modo geral, a coloração escura para calos é um indicador de condição inadequada para crescimento e desenvolvimento destes *in vitro*. No entanto, vale salientar que existe uma grande diversidade de colorações, citadas nas bibliografias, para calos embriogênicos de videira. Em virtude dos resultados observados neste trabalho indicarem que a coloração foi principalmente uma interação genótipo - meio de cultura - condições *in vitro*, esta não deve ser considerada como uma característica fundamental na caracterização de calos,



**Figura 10.** Calos de videira: a – Cabernet Sauvignon (coloração branca); b – Paulsen 1103 (coloração bege-clara); c – VR 043-43 (coloração bege-escura); d – VR 043-43 (coloração amarronzada). Imagens obtidas através de microscópio estereoscópio OLYMPUS SZH10, zoom 0,7.



**Figura 11.** Coloração dos calos induzidos a partir de pecíolos inoculados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1962) avaliada em três variedades de videira: Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon Meios de cultura acrescidos de 2,4-D (5  $\mu$ mol) e BAP (1  $\mu$ mol). Barras verticais representam os desvios padrões das médias.

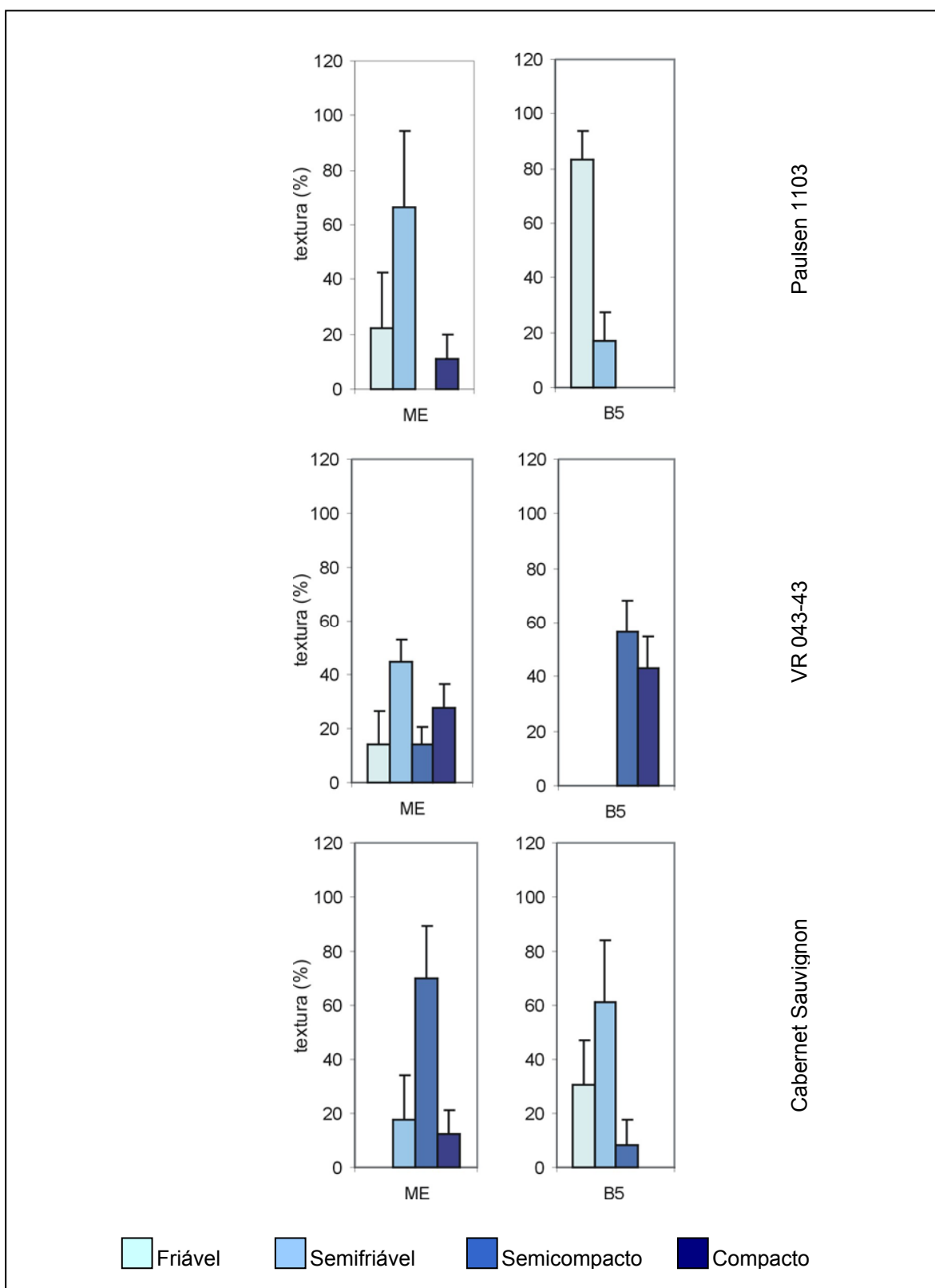


Os calos produzidos foram avaliados com relação a sua textura, conforme classificação estabelecida de quatro categorias: friável, semifriável, semicompacta e compacta.

Observou-se uma grande variação nos resultados sobre as texturas dos calos das variedades nos meios de cultura (**Figura 12**).

O porta-enxerto Paulsen 1103 em meio ME apresentou a maior porcentagem dos calos com textura semifriável (66,7%) e no meio B5 superioridade para textura friável (83,3%). O VR 043-43 em meio ME também apresentou a maior porcentagem de calos semifriáveis (44,4%). Já no meio B5, este porta-enxerto apresentou a maioria dos calos semicompactos (56,7%) e compactos (43,3%). A variedade Cabernet Sauvignon produziu maior porcentagem de calos semicompactos em meio ME (70%), e mais calos semifriáveis (61,1%) em meio B5.

Gray (1992) relata a obtenção de alta porcentagem de calos friáveis em meio de cultura N-1 (Nitsch & Nitsch, 1969 modificado) em embriões zigóticos de *Vitis rotundifolia*. Robacker (1993) observou que calos de coloração marrom-escura e acinzentada eram na maioria friáveis e produziam embriões. Para Perrin *et al.* (2001) calos friáveis foram altamente embriogênicos em porta-enxerto de videira 110R.



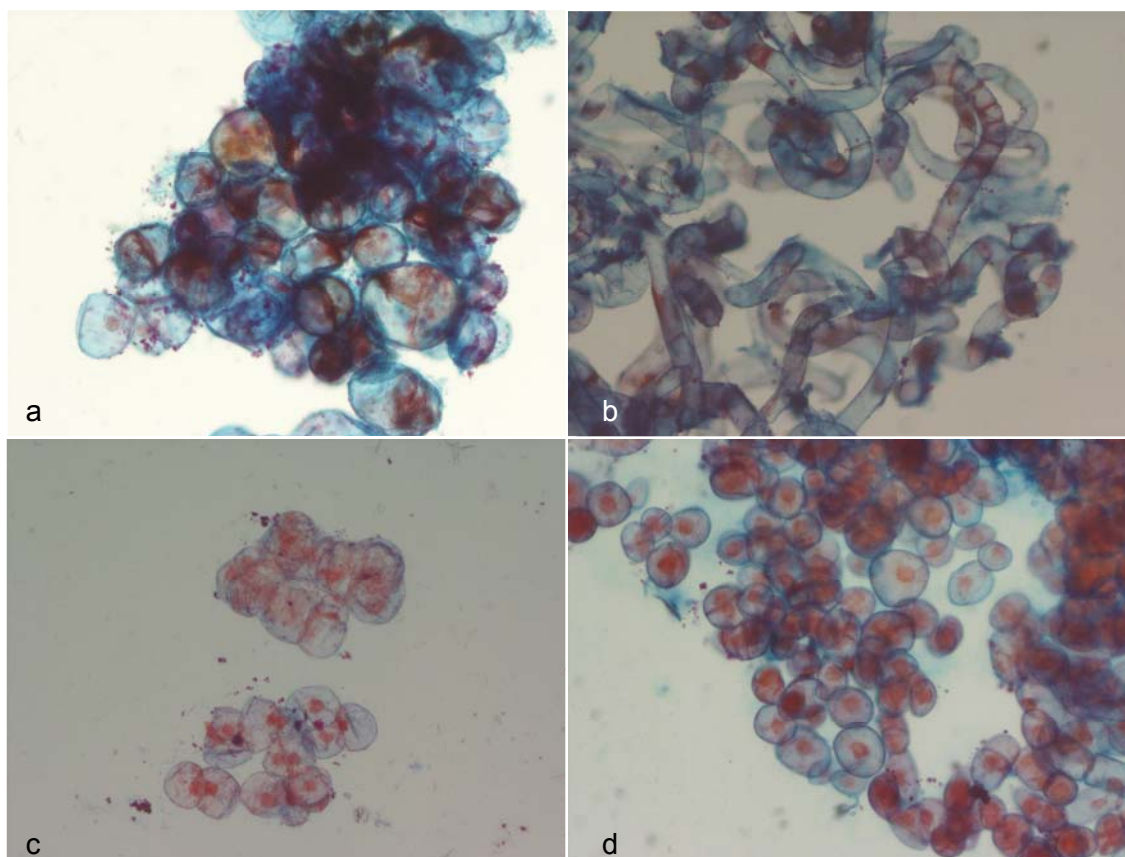
**Figura 12.** Textura dos calos induzidos a partir de pecíolos inoculados nos meios de cultura ME (Torregrosa, 1998) e B5 (Gamborg *et al.*, 1962) avaliada em três variedades de videira: Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon. Meios de cultura acrescidos de 2,4-D (5  $\mu$ mol) e BAP (1  $\mu$ mol). Barras verticais representam os desvios padrões das médias.

Para determinação do aspecto embriogênico, foram selecionadas as massas calosas friáveis e semifriáveis com a coloração mais abundante em cada tratamento. Estas foram observadas ao microscópio óptico para visualização das características morfológicas. Também foram feitas análises em dupla coloração com Carmim Acético e Azul de Evans (Gupta & Durzan, 1987).

Estas análises revelaram uma única variedade com aspecto embriogênico. A Cabernet Sauvignon apresentou células coradas de vermelho, arredondadas, pequenas e com núcleos proeminentes (Figura 14 – c, d). Estas características foram observadas para pecíolos de Cabernet Sauvignon inoculados nos meios de cultura ME (calos semifriáveis e bege-claros) e B5 (calos friáveis e bege-claros). As demais variedades apresentaram células alongadas e coradas de azul, o que caracteriza células calosas (**Figura 13 – a, b**).

Meios com alta concentração salina tais como o de MS e o B5 têm sido recomendados pelos efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento de embriões somáticos (Guerra *et al.*, 1998). O meio de cultura ME é constituído da metade da concentração de macronutrientes de MS onde a presença do nitrogênio está sob a forma de nitrato de amônio e no meio B5 o nitrogênio é adicionado em forma de sulfato de amônio. Mas estes dois meios de cultura disponibilizam simultaneamente nitrogênio na forma reduzida ( $\text{NH}_4^+$ ) e oxidada ( $\text{NO}_3^-$ ). Segundo Guerra *et al.* (1998) a forma como o nitrogênio é adicionado ao meio de cultura é determinante no sucesso da embriogênese somática; a adição simultânea de compostos nitrogenados, na forma reduzida e de nitrato, tem efeito estimulatório na embriogênese somática (Ammirato, 1983; Gleddie *et al.*, 1983). Com relação aos aminoácidos contidos no meio ME, Guerra *et al.* (1998) relatam que L-glutamina, ácido L-glutâmico e  $\alpha$ -alanina adicionados a meios contendo nitrato, favorecem a produção de maior número de embriões somáticos, além de ser mais uma fonte de nitrogênio.

A variedade Paulsen 1103 pode ser considerada ortodoxa, ou seja, que apresenta respostas aos estímulos externos, pois produziu uma grande área de calos tanto em meio ME como em meio B5, mas mesmo assim a cultura não apresentou características embriogênicas. As variedades VR 043-43 e Cabernet Sauvignon produziram calos com áreas menores.



**Figura 13.** Aspectos dos calos de três variedades de videira. (a) Paulsen 1103, meio ME (Torregrosa, 1998) acrescido de 2,4-D (5  $\mu\text{mol}$ ) e BAP (1  $\mu\text{mol}$ ); (b) VR 043-43, meio ME acrescido de 2,4-D (5  $\mu\text{mol}$ ) e BAP (1  $\mu\text{mol}$ ); (c) Cabernet Sauvignon, meio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) acrescido de 2,4-D (5  $\mu\text{mol}$ ) e BAP (1  $\mu\text{mol}$ ); (d) Cabernet Sauvignon, meio ME acrescido de 2,4-D (5  $\mu\text{mol}$ ) e BAP (1  $\mu\text{mol}$ ). Fotografias em microscópio óptico OLYMPUS BX40, 100X.

Os resultados obtidos para a Cabernet Sauvignon nos meios de cultura ME e B5 corresponderam a melhor forma de absorção do nitrogênio, como descrito por Guerra *et al.* (1998). No meio ME, apesar de conter a metade da concentração de macronutrientes de MS, a adição de aminoácidos favoreceu a produção de calos com aspecto embriogênico. O meio B5 mostrou-se mais eficiente quanto à produção de calos quando realizada uma média das três variedades estudadas.

## 6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a propagação *in vitro* através de gemas axilares, sem reguladores de crescimento, recomenda-se para multiplicação do porta-enxerto Paulsen 1103 o meio de cultura ME. Para as demais variedades, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon, sugere-se o meio DSD1, pois estas combinações apresentaram maior crescimento de parte aérea e principalmente acúmulo de massa seca.

A metodologia de gemas axilares, sem o uso de reguladores de crescimento, é uma técnica eficiente para propagação *in vitro* e apropriada para seleção, multiplicação e conservação de germoplasma *in vitro*.

A metodologia para calogênese e organogênese direta, através de explantes foliares, das variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon não mostrou resultados animadores na produção de gemas, brotos e raízes. No entanto, o meio de cultura ME com baixa concentração da citocinina (BAP) induziu e produziu calos brancos e semifriáveis. No entanto, após o período experimental, foi observada a formação de raízes.

Para a embriogênese somática as variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon responderam de diferentes maneiras aos tratamentos para indução e produção de embriões. O meio de cultura B5 induziu maior produção de calos para Paulsen 1103, já o meio ME foi melhor para VR 043-43 e Cabernet Sauvignon. Na variedade Cabernet Sauvignon ocorreu a indução e a formação de calos com aspecto embriogênico, mas não foi possível a obtenção de todas as fases de embriogênese somática.

Os resultados dos três trabalhos permitiram estabelecer diferenças nas respostas morfogênicas *in vitro* entre as três variedades avaliadas. O Paulsen 1103 apresentou melhores respostas aos estímulos externos, como meio de cultura e concentração/tipo/combinação de reguladores de crescimento, principalmente quando inoculado em meio ME, este mais enriquecido em Macroelementos, vitaminas e aminoácidos quando comparados aos meios B5 e DSD1. As variedades VR 043-43 e Cabernet Sauvignon apresentaram-se mais seletivas aos meios mais leves ou menos ricos em macroelementos e demais compostos.

## 7. RECOMENDAÇÕES

No decorrer da elaboração desta dissertação e através da autocrítica, foi possível perceber inúmeros fatores que necessitam, sem dúvida, de aperfeiçoamento. Para a continuidade dos trabalhos, é interessante que as metodologias sejam avaliadas de forma independente, com estudos aprofundados principalmente nas metodologias de organogênese e embriogênese de videira, já que foi possível observar o comportamento das variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon nos meios de cultura ME e B5.

Vale citar algumas variáveis observadas que são fundamentais para o aperfeiçoamento do protocolo. Em relação ao desenvolvimento de brotações através de gemas axilares, faz-se necessário um estudo aprofundado das concentrações de macroelementos, vitaminas e aminoácidos dos meios de cultura. Também o efeito do fotoperíodo e da radiação luminosa sobre o crescimento *in vitro*. Para a calogênese/organogênese, sem dúvida, existe a necessidade de novas pesquisas com diferentes reguladores de crescimento, bem como suas combinações e concentrações. Outro fator para esta metodologia é a utilização de novas fontes de explantes para o início da calogênese. Uma característica importante a ser avaliada é a textura dos calos, e recomendam-se experimentos que tenham início em condições de cultura com total ausência de radiação luminosa. Quanto à embriogênese somática, vale salientar o uso de outras auxinas, como NOA (ácido naftóxiacético) e também diferentes concentrações. Um fator determinante para culturas embriogênicas é o período de cultura em meio acrescido de auxina.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E.C.S.C.; XAVIER, A.; OTONI, W.C., 2004. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 421-430.

AMMIRATO, P.V. 1983. Embryogenesis. IN:EVANS, D.A.; SHARP, W.R. AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., ed. **Handbook of plant cell culture**: techniques for propagation and breeding. New York: Macmillan, v. 1, p. 82-123.

ARELLO, E.F.; PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P. 1989. Influência do ANA e BAP sobre a multiplicação de brotos de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv Melrose *in vitro*. **Ciência Prática**, Lavras, v.13, n.3, p.306-313.

BARIBAULT, T.J.; SKENE, K.G.M.; STEELE SCOTT, N. 1989. Genetic transformation of grapevine cells. **Plant Cell Reports**, v. 8, p. 137-140.

BARLASS M.; SKENE K.G.M. 1978. *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. **Vitis**, v. 17, p. 335–340.

BARROS, L.M. 1999. Embriogênese somática. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n.7, p.36-39.

BIASI, L. A.; PASSOS, I. R. S.; POMMER, C. V. 1998. Micropropagação do porta-enxerto de videira Jales. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 10, p. 1587-1594.

BONGA, J.M.; VON ADERKAS, P., 1992. ***In vitro* culture of trees**. Dordrecht: Kluwer Academic, 236p.

BONNER, J.1940. On the growth factor requirements of isolated roots. **American Journal of Botany**, v. 27, p. 692-701.

BORGHEZAN, M.; MORAES, L.K.A. de; MOREIRA, F.M.; SILVA, A.L. da, 2003. propagação *in vitro* e parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 783-789.

BOTTI, C.; GARAY, L.; REGINATO, G. 1993. The influence of culture dates, genotype and size and type of shoot apices on *in vitro* shoot proliferation of *Vitis vinifera* cvs. Thompson Seedless, Ribier and Black Seedless. **Vitis**, v. 32, n. 2, p.125-126.

BOUQUET, A. 1989. Intérêt des techniques de culture *in vitro* pour l'amélioration génétique de la vigne. **Bulletin OIV**, v. 697-698, p. 179-192.

BOUQUET, A.; PIGANEAU, B.; LAMAISSON, A.M. 1982. Influence du génotype sur la production de cals, d'embryoi"des et de plantes entières par culture d'anthe`res *in vitro* dans le genre *Vitis*. **Comptes Rendus de l'Acade´mie des Sciences**, v. 295, p.569-74.

BURKHARDT, S.L., 2001. **Avaliação de porta-enxertos de videira *in vitro* em condições de estresse por alumínio**. 75 p.. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

CABONI, E.; TONELLI, M.; FALASCA, G.; DAMIANO, C. 1996. Factors affecting adventitious shoot regeneration *in vitro* in apple rootstock 'Jork 9'. **Advances in Horticultural Science**, v.10, n.3, p.146-150.

CHALFUN, N. N. J.; DUARTE, G. de S.; PIVETTA, K. F.L.; KIAN, O. Y. K.; BRAHÃO, E.; ALVARENGA, A. A. 1992. Uso do ácido indolbutírico e da sacarose no enraizamento de estacas caulinares de porta-enxertos de videira 'RR 101-14'. **Ciência e Prática**, v. 16, n. 3, p. 389-393.

CHÉE, R.; CANTLIFFE, D.J. 1988. Selective enhancement of *Ipomoea batatas* Poir. embryogenic and non-embryogenic callus growth and production of embryos in liquid culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 15, p. 149-159.



CHÉE, R.; POOL, R.M., 1982. The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultured *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.16, n.1, p.17-27.

CHÉE, R.; POLL, R.M., 1983. *In vitro* vegetative propagation of *Vitis*: application of previously defined culture conditions to a selection of genotypes. **Vitis**, v. 22, p. 363-374.

CHÉE, R.; POOL, R.M. 1985. *In vitro* propagation of *Vitis*: the effects of organic substances on shoot multiplication. **Vitis**, v.24, p. 106-118.

CHÉE, R.; POOL, R.M. 1987. Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. **Scientia Horticultural**, v.32, p. 85-95.

CHENG, Z-M.; REISCH, B.I., 1989. Shoot regeneration from petioles and leaves of *Vitis X labruscana* 'Catawba'. **Plant Cell Reports**, v.8, p. 403-406.

CORRÊA, L.S.; BOLIANI, A.C. 2001. **Cultura de uvas de mesa do plantio à comercialização**. Ilha Solteira: Ed. Algraf, 328 p.

DAS, D.K. ; REDDY, M.K. ; UPADHYAYA, K.C. ; SOPORY, S.K. 2002. An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 999-1005.

DEVLIN, R.M. 1975. **Plant physiology**. Bed. New York, D. Van Nostrand Company. 585 p.

DESPLOBINS, G. 2001. **Resistence ou reactivité des producteurs face aux incitations des dispositifs institutionnels: lês viticultures riograndense et catarinense du sul-bresilien**. Montpellier. 157 p. Dissertação de Mestrado.

DING, A.P.; WANG, H.F. 1996. Factors affecting the differentiation of adventitious buds on apple leaves cultured *in vitro*. **China Fruits**, n.4, p.20-21.

DUNSTAN, D.I.; TURNER, K.E.; LAZAROFF, W.R. 1985. Propagation *in vitro* of apple rootstock M.4: effect of phytohormones on shoot quality. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.4, p.55-60.

EMERSHAD R.L.; RAMMING D.W. 1994. Somatic embryogenesis and plant development from immature zygotic embryos of seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). **Plant Cell Reports**, v. 14, p. 6–12.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. de L. 1994. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária. 179 p.

FALLOT, J. 1954. Cultures aseptiques de tiges de vigne prélevées juste avant et pendant l'ê repos hivernal. **Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse**, v. 90, p. 173-181.

FAVRE, J.M. 1977. Premiers résultats concernant l'obtention *in vitro* de néoformations caulinaires chez la vigne. **Annales de l'amélioration des Plantes**, v. 27, p. 151-169.

FERREIRA, R.B.; MONTEIRO, S.S.; PICARRA-PEREIRA, M.A.; TEIXEIRA, A.R. 2004. Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 168-173.

FILA, G.; GHASHGHAIE, J.; HOARAU, J.; CORNIC, G. 1998. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. **Physiological Plantarum**, v. 102, p.411-418.

GALLOTTI, G.J.M. 1991. Avaliação da resistência de *Vitis* spp. a *Fusarium oxysporum* Sch. f.sp. *herbemontis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 16, n. 1, p. 74-77.

GALLOTTI, G.J.M.; SHUCK, E. 1991. Ocorrência da Fusariose em porta-enxertos de videira. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 4, n. 1, p. 47-48.

GALZY, R. 1964. Technique de thermothérapie des viroses de la vigne. **Ann. Epiphyt.** v. 15, p. 245-256.

GALZY, R. 1969. Remarques sur la croissance de *Vitis riparia* cultivée in vitro sur différents milieux nutritifs. **Vitis**, v. 8, p. 191-205.

GALZY, R. 1985. Les possibilités de conservation *in vitro* d'une collection de clones de vignes. **Bulletin OIV**, v. 650, p. 378-390.

GALZY, R.; HAFFNER, V.; COMPAN, D. 1990. Influence of three factors on the growth and nutrition of grapevine microcutting. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, p. 295-443.

GAMA, M.I.C.S. 1993. **Produção de plantas transgênicas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) por transformação de calos embriogênicos por meio de *Agrobacterium tumefaciens***. Rio de Janeiro: UFRJ, 130 p. Tese de Doutorado.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158.

GAMBORG, O.L.; MURASHIGE, T.; THORPE, T.A.; VASIL, I.K. 1976. Plant tissue culture media. **In vitro**, v.12, n.7, p. 4738.

GEORGE, E.F.1993. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2<sup>o</sup> ed. London: Exegetics, v. 1.

GLEDDIE, S.; KELLER, W.; SETERFIELD, G. 1983 Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explant and cell suspensions of *Solanum melongena* (eggplant). **Canadian Journal of Botany**, v. 61, p. 656-666.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. 1998. Micropropagação: em TORRES, A. C., CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. EMBRAPA – SPI/ EMBRAPA – CNPH.

GRAY, D.J.; FICHER, L.C. 1985. *In vitro* shoot propagation of grape species, hybrids and cultivars. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 98, p. 172-174.

GRAY D.J, MORTENSEN J.A. 1987. Initiation and maintenance of long term somatic embryogenesis from anthers and ovaries of *Vitis longii* 'Microsperma'. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 9, p. 73–80.

GRAY, D.J. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) cultivars. **American Journal of Botany**, v. 79, n. 5, p. 542-546.

GREGORI, M.T.; TIZIO, R. 1997. Effect of the mycelium, diffused substances and extracts of the fungus *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link on the *in vitro* and *in vivo* growth of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon. **Vitis**, v. 36, v. 2, p. 36-65.

GRIBAUDO, I; FRONDA, A. 1991. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. **HortScience**, v. 26, n. 8, p.1083.

GRIBAUDO, I.; VALLANIA, R.; FRANKS, T.; MIAJA, M.L.; THOMAS, M. 2000. Genotype influence on somatic embryogenesis in grapevine anther and leaf cultures. Proc. VII Int'l Symp, on Grapevine genetics and Breeding. **Acta Horticulture**, 528 p.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. 1998. Embriogênese somática e sementes sintéticas. IN: TORRES A.C., CALDAS, L.S.; BUSO, J.M. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 2v., 864p.

GUERRA, P.M.; NODARI, R.O.; DIOLA, V. **Material didático de apoio da disciplina de Biotecnologia**. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Disponível em: <<http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila%20cultura%20de%20tecidos.htm>>. Acesso em: 10 de setembro de 2005.

GUPTA, P.K.; DURZAN, D.J. 1986. Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. **Bio/Technology**, v. 5, p. 147-151.

HARRIS, R.E.; STEVENSON, J.H. 1982. *In vitro* propagation of *Vitis*. **Vitis**, v. 21, n.1, p. 22-32.

HARTMAN, H.T.; KESTER, D.E. 1983. **Plant propagation**. 4 ed. New Jersey. Prentice Hall. 727 p.

HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J.N.; BOUDET, A.M.; TEULIÈRES, C. 2001. A procedure for shoot organogenesis in vitro from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, v.161, p. 645-653.

HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 33, n. 2, p. 105-119.

ICEPA – INSTITUTO DE PALNEJAMENTO E ECONOMIA AGRÍCOA DE SANTA CATARINA. 1986. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina**. Florianópolis.

ICEPA – INSTITUTO DE PALNEJAMENTO E ECONOMIA AGRÍCOA DE SANTA CATARINA. 1995. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina**. Florianópolis.

ICEPA – INSTITUTO DE PALNEJAMENTO E ECONOMIA AGRÍCOA DE SANTA CATARINA. 2004. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina. Florianópolis.**

IOCCO, P.; FRANKS, T.; THOMAS, M. R. 2001. Genetic transformation of major wine grape cultivars of *Vitis vinifera* L. **Transgenic Research**, v. 10, n. 2, p. 105-112.

JAYASANKAR, S.; GRAY, D.J.; LITZ, R.E. 1999. High-efficiency somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of grapevine. **Plant Cell Reports**, v.18, p. 533-537.

JOHNSON, H., 1989. **A Story of Wine**. London: Mitchell-Beazley. In: Academia do Vinho Ltda.

Disponível em: <<http://www.academiadovinho.com.br/biblioteca/historia.htm>>.

Acesso em: 17 de setembro de 2005.

JONA, R.; WEBB, K.J. 1978. Callus and axillary-bud culture of *Vitis vinifera* 'Sylvaner Riesling'. **Scientia Horticulturae**, v. 9, p. 55-60.

JOY IV, R.W.; THORPE, T.A. 1999. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry and molecular biology. In: SOH, W.Y.; BHOJWANI, S.S. (Ed.). **Morphogenesis in plant tissue culture**. London: Kluwer Academic, p. 171-214.

KORUZA, B.; JELASKA, S., 1993. Influence of meristem culture and virus elimination on phenotypical modifications of grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Refosk). **Vitis**, v.32, n.1, p.59-60.

KRUL, W.R. 1985. **In vitro propagation of vine**. USA, Patent n.4,532,733. August, 6.

KRUL, W.R.; MOWBRAY, G.H. 1984. Grapes. In: SHARP WR, EVANS D, AMMIRATO PV, YAMADA Y (eds). **Handbook of plant cell cultures**, v. 2. Crop species. Macmillan, New York, p.396-434.

KRUL, W.R. ; WORLEYJ.F. 1977. Foramation of adventicious embryosin callus cultures of 'Seyval', a French hybrid grape. **Journal of the American Society for Horticulture Science**, v.102, p. 360-363.

LEWANDOWSKI, V.T. 1991. Rooting and acclimatization of micropropagated *Vitis labrusca* .Delaware. **Horticultural Science**, v. 26, n. 5, p. 586-589.

LIMA DA SILVA, A. 1995. **Mutagenèse *in vitro* de porte-greffes de la Vigne: méthodologie d'irradiation, d'isolement et caractérisation de mutants**. 135 p.. Tese de Doutorado. Université de Bordeaux II, Bordeaux.

LIMA DA SILVA, A. ; HARISCAIN, P. ; OLLAT, N. ; DOAZAN, J.P. 2000. Comparative in vitro development of five grapevine rootstock varietis and mutants from the cultivar « Gravesac ». **Acta Horticulturae**, v. 528, p. 51-358.

LIMA DA SILVA, A.; DOAZAN, J.P. 1995. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliqué à des porte-greffes de Vigne *in vitro*. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 29, p. 1-9.

MARTINELLI, L; GIANAZZA, E.; VILLA, P.L. 1991. Somatic embryogenesis from leaves and petioles of grapevine. **Acta Horticulturae**, v. 289, p. 243-244.

MARTINELLI, L.; BRAGAGNA, P.; POLETTI, V.; SCIENZA, A. 1993. Somatic Embryogenesis from leaf and petiole derived callus of *Vitis rupestris*. **Plant Cell Reports**, v. 12, p. 207-210.

MARTINELLI, L.; POLETTI, V.; BRAGAGNA, P.; POZNASKI, E. 1996. A study on organogenic potential in the *Vitis* genus. **Vitis**, v. 35, n. 4, p. 159-161..

MARTINELLI, L.; CANDIOLI, E.; COSTA, D.; POLETTI, V.; RASCIO, N. 2001. Morphogenic competence of *Vitis rupestris* S. secondary somatic embryos with a long culture history. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 279-284.

MARTINS, F.P., 2005. **Aspectos da viticultura brasileira**. Sindicato Rural de Jundiaí. Disponível em:< <http://www.srjundiai.com.br/aspectos.htm>> Acesso em: 17 de setembro de 2005.

MARTINS, T.M.; DOMINGOS, A.; NOVO, C.; LOURENCO, P.M.L. 2003. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* infection on *in vitro* rooting of *Vitis viníferas*. **Vitis**, v. 42, n. 3, p. 159-161.

MATSUTA, N. 1992. Effect of auxin on somatic embryogenesis from leaf callus in grape (*Vitis* spp.). **Japanese Journal of Breeding**., v. 42, p. 879-883.

MELLO, L.M.R. de. 2004. EMBRAPA: **Atuação do Brasil no Mercado Internacional de Uvas e Vinhos – Panorama 2004**:  
<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/panorama2004.pdf>,  
Acesso em 02/06/2005.

MHATRE, M., SALUNKE, C.K., RAO, P.S., 2000. Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards an improved protocol. **Scientia Horticulturae**, v. 84, p. 357-363.

MOREIRA, F.M. 2000. **Avaliação morfo-fisiológica e bioquímica do porta-enxerto de videira “Paulsen1103” *in vitro***. 91 p.. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MOREL, G. 1944. **Sur le développement de tissus de vigne cultivés *in vitro***. C. R. Soc. Biol. (Paris) 138, 62.

MOREL, G. M.; MARTIN, C., 1952. Guérison de dahlias atteints d’une maladie à virus. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L’ Academie des Sciences**, v. 235, p. 1324-1325.



MORIGUCHI, T.; KOZAKI, I.; MATSUTA, N.; YAMAKI, S. 1988. Plant regeneration from grape callus stored under a combination of low temperature and silicone treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 15, p. 67-71.

MOZSÁR, J.; VICZIÁN, O. 1996. Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis* spp. **Vitis**, v. 35, n. 4, p. 155-157.

MULLINS, M.G; SRINIVASAN, C. 1976. Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv 'Cabernet-Sauvignon') by apomixis *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, v. 27, p. 1022–1030.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassay with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497.

NITSCH, J.P.; NITSCH, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. **Science**, v. 163, p. 85-87.

OLÁH, R.; SZEGEDI, E.; RUTHNER, S.; KORBULY, J. 2003. Thidiazuron-induced regeneration and genetic transformation of grapevine rootstock varieties. **Vitis**, v. 42, n. 3, p. 133-136.

OLIVEIRA, M.M. 2000. Biotecnologia Molecular: Avanços e Aplicações: Aplicações e Avanços na Área da Biotecnologia Vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, n. 66, agosto, p. 22-27.

PASQUAL, M. 1985. Obtenção de plantas por cultura de tecidos. **Informe Agropecuário**, v. 11, n. 124, p. 6368.

PASQUAL, M.; ISHIDA, J.S. 1992. Efeito de reguladores de crescimento na proliferação *in vitro* de brotos do porta-enxerto de macieira MI-793. **Revista Ceres**, v.39, n.233, p.584-590,

PASSOS, I. R. da S.; SONDAHL, M.R.; RIBEIRO, I.J.A.; TERRA, M.M.; PIRES, E.J.P. 1985. Cultura *in vitro* de meristemas de videira. I. Concentrações do hormônio 6-BA em meio primário. **Bragantia**, v.44, n.1, p.473- 479.

PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. 1992. Multiplicação *in vitro* de brotações do porta-enxerto de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n. 4, p. 617-622.

PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. 1994. Efeitos de benzilaminopurina e ácidonaftalenoacético na multiplicação *in vitro* de brotações do porta-enxerto de videira (*Vitis* spp.) "RR-101-14". **Revista Ceres**, v. 41, n. 236, p. 358-365.

PELET, F.A., HILDEBRANDT, C., RIKER, A.J.; SKOOG, F. 1959. Growth *in vitro* of tissues isolated from normal stems and insect galls. **American Journal of Botany**, v. 47, p. 186-195.

PERL, A.; ESHDAT, Y. 1998. DNA transfer and gene expression in transgenic grapes. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 365-386.

PÉROS, J.P.; TORREGROSA, L.; BERGER, G., 1998. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 319, p. 171-179.

PERRIN, M.; MARTIN, D.; JOLY, D.; DEMANGEAT, G.; THIS, P.; MASSON, J.E. 2001. Medium-dependent response of grapevine somatic embryogenic cells. **Plant Science**, v. 161, p. 107-116.

PIERIK, R.L.M., 1997. ***In vitro* culture of higher plants**. 4° ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 348 p.

PIRES, E.J.P.; BIASI, L. A., 2003. Propagação da videira. In: POMMER, C.V. **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p.295-350.

POPESCU, C.F. 1996. Somatic embryogenesis and plant development from anther culture of *Vitis vinifera* (L.). **Plant Growth Regulation**, v. 20, p. 75–78.

POPESCU, C.F.; GORENFLOT, R.; RAICU, P. 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* L. **Rev. Citol. Biol. Veg. Bot.**, v. 18, p. 15-20.

PRAKASH, C.S. & VARADARAJAN, U. 1992. Genetic transformation of sweetpotato. In: HILL, W.A.; BONSI, C.K. & LORETAN, P.A., ed. **Sweetpotato technology for the 21th century**. Tuskegee: Tuskegee University, p. 27-37.

RAJASEKARAN, K.; MULLINS, M.G. 1981. Organogenesis in internod of grapevines. **Vitis**, v. 20, p. 218-227.

RAJASEKARAN, K.; MULLINS, M.G. 1983. The origin of embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. **American Journal Of Enology And Viticulture**, v. 34, p. 108-113.

REINERT, J. 1958. Morphogenese und ihre kontrolle an geweberkulturen aus karotten. **Naturwissenschaften**, v. 45, p. 344-345.

ROBACKER, C. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from Muscadine grape leaf explants. **Horticultural Science**, v. 28, p. 53–55.

ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A.; ZIVANOVITC, S. B. 1991. A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. **Horticultural Science**, Alexandria, v. 26, n. 12, p. 1551-1553.

ROSIER, J.P.; LOSSO, M. 1997. Cadeias produtivas do Estado de Santa Catarina: Vitivinicultura. Florianópolis, EPAGRI, 41 p. (**Boletim Técnico**, n. 83).

SALUNKHE, C.K.; RAO, P.S.; MHATRE, M. 1999. Plantlet regeneration via somatic embriogenesis in anther callus of *Vitis latifolia* L. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 670-673.

SARWAR, M.; SKIRVIN, R.M. 1997. Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of 'McIntosh' apple (*Malus ´ domestica* Borkh.) *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.68, n.1-4, p.95-100.

SCHENK, R.O.; HIDELEBRANDT, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, v. 50, p. 199-204.

SCHUCK, E.; ANDRADE, E.R. de; GALLOTTI, G.J.M.; DALBÓ, M.A. 1993. Novas alternativas na busca de soluções de controle para o declínio da videira. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 6, n. 4, p. 4-50.

SCHULTHEIS, J.R.; CHÉE, R.P.; CANTLIFFE, D.J. 1990. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., ed. **Técnicas e aplicações da cultura d tecidos de plantas**. Brasília: Imprensa Nacional, 433 p.

SHARP, W.R.; SONDAHL, M.; CALDAS, L.S.; MARAFFA, S.B. 1980. The physiology on *in vitro* asexual embryogenesis. **Horticultural Review**, v. 2, p. 268-310.

SILVA, A.L. da, 2002. Programa de certificação de mudas de videira em Santa Catarina. IN: **VITICULTURA e ENOLOGIA**: atualizando conceitos. Caldas: Epamig, p. 215-231.

SILVA, A. L. da; SCHUCK, E.; HARISCAIN-LAFITTE, P.; PARIZZOTTO, A. 1997. Cultura *in vitro* do porta-enxerto de videira var. 043-43 resistente a fusariose. IN: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE FRUTÍFERAS**, 1., 1997, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: Unesp, p. 51-53.

SIMÃO, S. 1971. **Manual de fruticultura**. São Paulo: Melhoramentos, 454 p.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-130.

SOUSA, J. S. I. 1969. **Uvas para o Brasil**. Campinas: IAC. 456 p.

SOUSA, J.S.I . de; MARTINS, F.P., 2002. **Viticultura Brasileira: principais variedades e suas características**. Piracicaba: FEALQ, 368 p.

STAMP, J.A.; MEREDITH, C.P. 1988. Proliferative somatic embryogenesis from zygotic embryos of grapevine. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 113, n. 6, p. 941-945.

STAMP, J.A.; COLBY, S.M.; MEREDITH, C.P. 1990. Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape (*Vitis* spp.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 22, p. 27–33.

STEWART, F.C.; MAPES, M.O.; MEARS, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization of cultures from freely suspended cells. **American Journal of Botany**, v. 45, p. 705-708.

SUGIYAMA, M., 1999. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 61-64.

THIES, K.L.; GRAVES Jr., C.H., 1992. Meristem micropropagation protocols for *Vitis rotundifolia*. **Michx. Hort. Sci.**, v. 27, p. 447-449.

THORPE, T.A. 1980. Organogenesis *in vitro*: structural, physiological, and biochemical aspects. II: VASIL, I.K. (Ed.). **Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture**. Academic Press. New York, p. 71-111.

TISSERAT, A.B.; ESAN, B.B.; MURASHIGE, T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. **Horticultural Review**, v. 1, p. 1-78.

TORREGROSA, L. 1998. A simple and efficient method to obtain stable embryogenic cultures from anthers of *Vitis vinifera* L. **Vitis**, v. 37, n.2, p. 91-92.

TORREGROSA, L.; BOUQUET, A. 1995. *In vitro* propagation of *Vitis x Muscadinia* hybrids by microcuttings or axillary budding. **Vitis**, v. 34, n. 4, p. 237-238.

TORREGROSA L.; LE GALL O.; DANGLLOT Y.; CANDRESSE T.; BOUQUET A. 1994. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of somatic embryos of grapevine and regeneration of transgenic plants producing the capsidial protein of the grapevine chrome mosaic virus, GCMV. IN: **6th International Symposium on Grape Breeding**, Yalta, Crimea, Ukraine, 4-10 September, p. 91-98.

TORREGROSA, L.; TORRES-VIALS, M.; BOUQUET, A. 1995. Somatic embryogenesis from leaves os Vits x Muscadinia hybrids. **Vitis**, v. 34, n. 4, p. 239-240.

TRONCOSO, A.; CANTOS, M.; LIÑÁN, J.; PRIETO, J.; SARMIENTO, R., 1988. The use of *in vitro* culture and tubular container system to propagate selected grapevine plants for sherry wine production. **Acta Horticulturae**, n.227, p.358-362.

VASIL, I.K. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. IN: FUJIWARA, A. **Plant Tissue Culture**. Tokyo: Maruzen, p. 101-103.

VICZIÁN, O.; MOZSÁR, J. 1996. Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis* spp. **Vitis**, v. 35, n. 4, p. 155-157.

VIRSCEK, M.M.; JARVONIK, B.; BOHANEK, B.; KREFT, I. 1994. Thidiazuron stimulated shoot regeneration from *in vitro* leaves of apple cultivars. **Proceedings of the International Colloquium on Impact of Plant Biotechnology on Agriculture**, Rogla, Slovênia, Vol.5-7, p.91-95.

WARRAG, E.; LESNEY, M.S.; ROCKWOOD, D.J. 1991. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 586-589.

WHITE, P.R. 1939. Glycine in the nutrition of the excised tomato roots. **Plant Physiology**, v. 14, p. 527-538.

WILHELM, E. 1999. Micropropagation of juvenile sycamore maple via adventitious shoot formation by use of thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 57, p. 57-60.

WILLIAMS, E.S.; MAHERWARAN, B. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462.

YEUNG, E.C. 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. IN: THORP, T.A., ed. ***In vitro embryogenesis in plants***. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 205-547.

YU, D.; MEREDITH, C.P. 1986. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.111, n.6, p.972-975.

YUI, E.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; NAGIG, N.; CHALFUN, J.; ISHIDA, J.S. 1993. Efeito de reguladores de crescimento sobre a proliferação *in vitro* de porta-enxertos de macieira cv. M.7. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.28, n.5, p.597-602.

ZATIKO, J.M.; MOLNAR, I. 1985. Preliminary results on the *in vitro* mass propagation of grapes from shoot-tip meristem. **Fruit Science Reports**, v. 12, p. 83-85.

ZLENKO, V.A.; TIROSIN, L.P.; KOTIKOV, I.V. 1995. An optimizes medium for clonal micropropagation of grapevine. **Vitis**, v. 34, n. 2, p. 125-126.

## **ANEXOS**



**Anexo 1:** Composição do meio de cultura ME (Torregrosa, 1998).

Macroelementos	Concentração final em 1 litro de meio (mg)	Quantidade da solução no meio de cultura
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825	100 ml.l <sup>-1</sup>  (SOLUÇÃO MACRO)
KNO <sub>3</sub>	950	
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	220	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85	
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	185	
Microelementos		
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	16,9	5,0 ml.l <sup>-1</sup>  (SOLUÇÃO MICRO)
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8,6	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	
KI	0,83	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,25	
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,025	
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,025	
Fe-EDTA		
Na <sub>2</sub> EDTA . 2H <sub>2</sub> O	37,25	10,0 ml.l <sup>-1</sup> (SOLUÇÃO FERRO)
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	27,85	
Vitaminas		
Tiamina	10,0	1,0 ml.l <sup>-1</sup>
Piridoxina	1,0	
Ác. Nicotínico	10,0	
Inositol	100	
Biotina	0,01	
Pantotenato Cálcio	1,0	
Aminoácidos		
Glutamina	100	4,0 ml.l <sup>-1</sup>
Fenilalanina	10,0	
Glicina	2,0	
Caseína Hidrolizada		1,0 g.l <sup>-1</sup>
Sacarose		30 g.l <sup>-1</sup>
Agar-Agar		6,0 g.l <sup>-1</sup>
pH	6,0	

**Anexo 2:** Composição do meio de cultura DSD1 (Lima da Silva & Doazan, 1995).

Macroelementos	Concentração final em 1 litro de meio (mg)	Quantidade da solução no meio de cultura
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> KNO <sub>3</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O Ca(NO <sub>3</sub> ) . 4H <sub>2</sub> O	100 1000 100 180 500	100 ml.l <sup>-1</sup>  (SOLUÇÃO MACRO)
Microelementos		
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	1,2 1,0 1,0 0,025 0,025	10,0 ml.l <sup>-1</sup>  (SOLUÇÃO MICRO)
Fe-EDTA		
Na <sub>2</sub> EDTA.2 H <sub>2</sub> O FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	37,50 27,50	10,0 ml.l <sup>-1</sup>
Vitaminas		
Tiamina Piridoxina Ác. Nicotínico Inositol	1,0 1,0 1,0 10,0	1,0 ml.l <sup>-1</sup>
Aminoácidos		
Glutamina Fenilalanina Glicina	100 10 2	4,0 ml.l <sup>-1</sup>
Sacarose Agar-Agar		20 g.l <sup>-1</sup> 6,0 g.l <sup>-1</sup>
pH	6,3 – 6,4	

**Anexo 3:** Composição do meio de cultura B5 (Gamborg *et al.*, 1968).

Macroelementos	Concentração final em 1 litro de meio (mg)	Quantidade da solução no meio de cultura
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> KNO <sub>3</sub> CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	134 2500 150 250 150	100 ml.l <sup>-1</sup>  (SOLUÇÃO MACRO)
Microelementos		
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> KI Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	10,0 2,0 3,0 0,75 0,25 0,025 0,025	5,0 ml.l <sup>-1</sup>  (SOLUÇÃO MICRO)
Fe-EDTA		
Na <sub>2</sub> EDTA . 2H <sub>2</sub> O FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	37,25 27,85	10,0 ml.l <sup>-1</sup> (SOLUÇÃO FERRO)
Vitaminas (MM)		
Tiamina Piridoxina Ác. Nicotínico Inositol	10,0 1,0 1,0 100,0	5,0 ml.l <sup>-1</sup>
Sacarose Agar-Agar		20,0 g.l <sup>-1</sup> 6,0 g.l <sup>-1</sup>
pH	5,5	